SÉRIE A,
N° 4571

N° D'ORDRE
5418

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Jacques PILLOT

1re THÈSE : **Contribution à l'étude du genre Treponema : Structures anatomique et antigénique.**

2e THÈSE : **Propositions données par la Faculté : Les acides teichoïques.**

Soutenues le 29 Juin 1965 devant la Commission d'examen.

MM. LWOFF *Président*
SCHAEFFER } *Examinateurs*
Mlle STAUB }

LONS - LE - SAUNIER
IMPRIMERIE MAURICE DECLUME

1965

SÉRIE A,
N° 4571

N° D'ORDRE
5418

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Jacques PILLOT

1re THÈSE : **Contribution à l'étude du genre Treponema : Structures anatomique et antigénique.**

2e THÈSE : **Propositions données par la Faculté : Les acides teichoïques.**

Soutenues le 29 Juin 1965 devant la Commission d'examen.

MM. LWOFF *Président*
SCHAEFFER } *Examinateurs*
Mlle STAUB }

LONS - LE - SAUNIER
IMPRIMERIE MAURICE DECLUME

1965

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen ..... M. ZAMANSKY.

BRELOT ..... T Analyse supérieure.
PRENANT ..... T Anatomie et Histologie comparées.
GRASSÉ ..... T Evolution des êtres organisés.
PRÉVOST ..... T Chimie organique.
WYART ..... T Minéralogie et Cristallographie.
TEISSIER ..... T Zoologie.
MANGENOT ..... T Biologie végétale (Orsay).
AUGER ..... T Physique quantique et relativité.
MONNIER ..... T Physiologie générale.
PIVETEAU ..... T Paléontologie.
ROCARD ..... T Physique E.N.S.
CARTAN ..... T Mathématiques (E.N.S.).
LAFFITTE ..... T Chimie générale.
N..... T Géométrie supérieure.
COULOMB ..... T Physique du globe.
Mlle COUSIN ..... T Biologie anim. S P.C.N.
CHRÉTIEN ..... T Chimie minérale.
BOCQUET ..... T Zoologie.
KASTLER..... T Physique E N S.
EPHRUSSI ..... T Génétique.
RIVIÈRE ..... T Géologie S.P.C.N. et sédim. (Orsay).
GAUTHERET ..... T Biologie végét. P.C.B.
LUCAS R..... T Recherches physiques.
THOMAS A. ..... T Biologie cellulaire.
ARNULF ..... T Optique appliquée.
MORAND..... T Physique Enseignement.
SOLEILLET ..... T Physique. P.C.B.
FORTIER ..... T Mécanique expérimentale des fluides.
DRACH..... T Zoologie.
QUENEY ..... T Météorologie et dynamique atmosphérique.
GALLIEN ..... T Embryologie
EICHHORN ..... T Botanique.
DE CUGNAC ..... T Biologie végét. S.P.C.N.
Mlle CAUCHOIS ... T Chimie-Physique.
THELLIER ..... T Physique du Globe.
L'HÉRITIER ..... T Biologie générale (Orsay).
GRIVET ..... T Radioélectricité (Orsay).
PONCIN ..... T Mécanique générale.
DU BREIL..... T Arithmétique et théorie des nombres.
QUELET ..... T Chimie organique.
CAGNIARD ..... T Géophysique appliquée.
CHAMPETIER ..... T Chimie macromoléculaire.
CUVILLIER ..... T Micropaléontologie.
JUNG ..... T Géologie.
TRILLAT ..... T Microscopie et diffraction électronique.
WIEMANN ..... T Chimie organique structurale.
JACQUINOT ..... T Spectroscopie et physique céleste (Orsay).
VASSY ..... T Physique de l'atmosphère
DESTOUCHES ..... T Théories physiques.
AMIEL ..... T Chimie génér.
HOCART ..... T Minéralogie et Cristallographie.
J.-P. MATHIEU.... T Physique Optique.
COUTEAUX ..... T Cytologie.
MAY ..... T Zoologie.
CHOQUET ..... T Théor. des fonct. et topologie.
FELDMANN ..... T Biologie végétale marine.
GUINIER ..... T Physique des solides (Orsay).
JOST ..... T Physiol. comparée.
FORTET..... T Calcul des probabilités et Phys. math.
SCHWARTZ ..... T Calcul différentiel et intégral.
CHOUARD ..... T Physiologie Végétale.
MALAVARD ..... T Aviation (Tech. aéronaut).
NORMANT..... T Synthèse organique.
BENARD ..... T Chimie minérale.
BUVAT ..... T Botanique E.N.S.
DUGUE ..... T Statistiques Math.
SOULAIRAC ..... T Psychophysiologie.
ULRICH ..... T Physiol. végétale appl.
MARÉCHAL ..... T Optique théorique et appl.
KIRRMANN ..... T Théories chimiques.
CHADEFAUD ..... T Botanique.
Mlle LE BRETON.. T Physiologie de la nutrition.
LELONG ..... T Application de l'analyse à la géométrie.
DEVILLERS..... T Anatomie et Histologie comparées.
EHRESMANN ..... T Topologie algébrique.
FRANÇON..... T Physique S.P.C.N.
GLANGEAUD..... T Géographie physique et Géologie.
DODEMENT ..... T Mathématiques M.G.P.
PISOT ..... T Technique mathématique de la physique.
ROCH ..... T Géologie.

Schatzmann	T	Astrophysique.
Termier	T	Géologie générale.
Zamansky	T	Mathématiques générales.
Lennuier	T	Physique M.G.P.
Rizet	T	Génétique (Orsay).
Routhier	T	Géologie appliquée.
Mme Tonnelat	T	Physique théorique.
Dixmier	T	Mathématiques M.P.C.
Souchay	T	Chimie générale
Aigrain	T	Electrotechnique générale.
Brusset	T	Chimie systématique.
M. Lévy	T	Physique théorique des hautes énergies. (Orsay).
Mme Chaix	T	Chimie biologique.
Mme Hurel-Py	T	Biologie végétale P.C.B
Pannetier	T	Chimie générale.
Brun	T	Mécanique des fluides I.
Lederer	T	Chimie biologique (Orsay).
Mme Dubreil	T	Mathématiques (Agrégation).
Mme Lelong	T	Mathémat. II E.N.S.
Bellair	T	Géologie S.P.C.N.
Cotte	T	Physique électricité.
Dubois J.-E.	T	Chimie organique.
Lamotte	T	Zoologie E.N.S.
Michel A.	T	Chimie minérale (Orsay).
Olmer	T	Energétique générale.
Rouault	T	Electricité (Orsay).
Gauthier	T	Mécanique appliquée.
Barchewitz	T	Chimie physique.
Brossel	T	Physique atomique.
Buser	T	Physiologie comparée.
Camus	T	Physiologie végétale.
Castaing	T	Phys. II thermo (Orsay)
Curien	T	Minéralogie et Cristallographie.
Moyse	T	Physiologie végétale (Orsay).
Mme Charniaux-Cotton	T	Evolution des êtres organisés.
Possompes	T	Zoologie.
Pullmann	T	Chimie quantique.
Teillac	T	Physique nucléaire et radioactivité (Orsay).
Tonnelat	T	Biologie physico-chimique (Orsay).
Ville	T	Econométrie.
Willemart	T	Chimie P.C.B.
Dodé	T	Chimie (Orsay).
Freymann	T	Recherches physiques.
Guinochet	T	Biologie vég. S.P.C.N. (Orsay).
Rollet	T	Chimie minérale.
Mlle Josien	T	Chimie S.P.C.N.
Chevalley	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes.
Arnoult	T	Electronique (Orsay).
Chapelle	T	Physique I (Orsay).
Delange	T	Mathématiques I (Orsay).
Deny	T	Mathématiques générales (Orsay).
G rmain P.	T	Mécanique théorique des fluides.
Lucas G.	T	Géologie.
Allard	T	Chimie physique.
Berthelot	T	Phys. des particules fondamentales (Orsay).
Bricard	T	Météorologie et physique de l'atmosphère.
Mme Albe-Fessard	T	Psycho-physiologie.
Friedel	T	Physique des solides (Orsay).
M. Julia	T	Etudes des moléculaires complexes.
Lender	T	Biologie animale S.P.C.N. Orsay.
Magat	T	Physico-chimie des radio-éléments
Mlle Quintin	T	Electrochimie.
Monod	T	Chimie du métabolisme.
Benoit	T	Physiologie animale (Orsay).
De Possel	T	Analyse numérique.
Charlot	T	Chimie analytique.
Lemee	T	Ecologie Vég. (Orsay).
Guerin	T	Chimie M.P.C. (Orsay)
Chatelet M.	T	Chimie P.C.B.
Jean.	T	Physique nucléaire (Orsay)
Mattler	T	Physique S.P.C.N.
Bergerard	T	Zoologie (Orsay).
Bertein	T	Electronique (Orsay).
Bouissieres	T	Radiochimie.
Mme Couture	T	Thermodynamique et Mé can. physique.
Ellenberger	T	Géologie des grandes régions du globe (Orsay).
Franc.	T	Biologie animale P.C.B.
Schnell		Botanique tropicale.
Stolkowski.	T	Physiologie chimique.
Acher.	T	Chimie biologique.
Baudoin	T	Biologie animale P.C.B.
Beaumont		Biologie animale S.P.C N.
Blamont	T	Géophysique ionosphère.
Boureau	T	Botanique.
Curie D.	T	Physique M.G.P.
Durand-Delga	T	Géologie.
Freon	T	Chimie organique (Orsay).
Heller	T	Physiologie végétale.
Tortrat.	T	Calcul des Probabilités.
Cailleux	T	Géologie S.P.C.N.
Magnan	T	Physique électricité.
Daudel	T	Mécanique ondulatoire appliquée à la Chimie théor. et la Phys. nucléaire.
Mlle Fourcroy		Biologie végétale S P.C. N.
Mme Choquet-Bruhat	T	Méc. analytique et Méc. céleste.
Mlle Viel	T	Physiologie générale.
Lwoff	T	Microbiologie.
Siestrunck	T	Mécan. physique et expérimentale.
Lacombe	T	Métallurgie des métaux nucléaires (Orsay).
Brochard.	T	Physique P.C.B. (Orsay).
Cabannes	T	Mécanique générale.
Lesieur	T	Mathématiques I (Orsay).

Mazet	T	Mécanique générale (Orsay).
Caire		Géographie physique et Géologie dyn.
Comolet		Mécanique des Fluides.
Corabœuf	T	Physiologie animale (Orsay).
Delloue	T	Physique de l'Exosphère.
Gorenflot		Botanique II (Orsay).
Houillon		Biologie animale P.C.B.
Jullien J.		Chimie SPCN (Orsay).
Malgrange	T	Technique mathématique de la Phys. (Orsay).
Olivier		Anthropologie.
Nozeran	T	Botanique II (Orsay).
Blanc-Lapierre	T	Physique E.N.S. (Orsay).
Chevaugeon	T	Botanique (Orsay).
Kahane	T	Mathématiques (Orsay).
Samuel	T	Mathématiques ENS féminines.
Kourganoff	T	Astronomie (Orsay).
Thiry	T	Mécanique céleste.
Abeles		Physique SPCN.
Amat	T	Physique PCB.
Auboin	T	Géologie.
Mme Benoit-Gueutal	T	Phys. Nucléaire et radioactivité (Orsay).
Bougis		Biologie marine (Villefranche-sur-Mer.)
Bruhat	T	Mathématiques MPC.
Brunn	T	Géologie historique (Orsay).
Chabral	T	Physique MGP (Orsay).
Deheuvels	T	Mathématique Propé.
D'Espagnat	T	Physique théorique (Orsay).
Furon	T	Géologie SPCN.
Mme Gans	T	Génétique.
Geneves		Biologie végétale PCB.
Guilbert		Physique (CUS Orléans).
Hupe	T	Pétrographie.
Hollande	T	Biologie générale.
Lions	T	Analyse numérique.
Maitte	T	Chimie PCB.
Meyer		Physique propédeutique.
Nicolas		Géologie appliquée.
Panigel		Biologie générale.
Ravier		Pétographie.
Roseau	T	Méca. théor. des fluides.
Roubine	T	Electronique.
Silber	T	Chimie PCB.
Uebersfeld	T	Electronique.
Yvon	T	Théories Physiques.
Herve	T	Mathématiques.
Neron	T	Mathémat. MPC (Orsay).
Mme Pecker-Wimel	T	Astrophysique.
Balkansky		Physique MPC.
Le Corre	T	Electricité.
Delcroix	T	Physique théorique (Orsay).
Gourdin		Phys. Théor. des Hautes-Energies (Orsay).
Lehmann	T	Phys. Exp. des Hautes-Energies (Orsay).
Nataf	T	Physique nucléaire et radioactivité (Orsay).
Echalier		Biologie animale PCB.
Barraud		Physiologie cellulaire.
Lioret		Physiologie végét. Orsay.
Dars		Géologie struc. et Geol. appliquée.
Camefort	T	Botanique ((agrégation).
Vichniewsky	T	Mécanique industrielle.
Blaquiere		Electronique (Orsay).
Arnous	T	Physique théorique.
Tatibouet		Chimie (CSU Orléans).
Malliavin	T	Mathématique propé. (Orsay).
Gaudemar		Chimie Propéd.
Perez y Jorba		Phys. Exp. des Hautes énergies (Orsay).
David	T	Chimie (Agrég. Orsay).
Brousse	T	Mécanique théorique.
Rosch	T	Astronomie.
Guy	T	Physique expérimentale.
Lazard		Math. M.P.C.
Morel Pierre		Physique M.P.C.
Arsac		Programmation.
Lefebvre		Chimie M.P.C.
Chapeville		Biochimie.
Benoit		Physique C.P.E.M.
Rio		Chimie C.P.E.M.
Jauzein		Géologie. E.N.S.
Prevost Georges		B.V. C.P.E.M.
Favard P.		B.A. C.P.E.M.
Vilkas		Chimie C.P.E.M.
Mlle Ficini		Chimie C.P.E.M
Lequeux		Astronomie.
Cohen Tannoudji		Physique M.P.C.
Tavernier		Physique C.P.E.M.
Mme Roizen		Physique C.P.E.M.
Durand M.		B.A. S.P.C.N.
Pascaud		Physiologie.
Mme Petit		B.A. C.P.E.M.
Brousse		Géologie (Orsay)
Cagniac		Physique (agrégation Orsay).
Leberre		Zoologie (Orsay).
Schaeffer		Microbiologie (Orsay).
De Gennes		Physique des solides (Orsay).
Riou		Physique nuclé. exp. (Orsay).
Clauser		Chimie biolo. (Orsay).
Chevalier		Physio. animale (Orsay).
Jancovici		Physique atomique (Orsay).
Falk-Vairant		Physique nucléaire (Orsay).
Fetizon		Chimie propé. (Orsay).
Cerf		Mathématiques (Orsay).

Secrétaire Général..... R. Poullain.

A MA FEMME.

A DIDIER, ANNE ET FLORENCE.

A MES PARENTS ET BEAUX-PARENTS ET A TOUTE MA FAMILLE.

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

REMERCIEMENTS.

Le Professeur A. Lwoff nous a fait le grand honneur de s'intéresser à nos problèmes scientifiques, de diriger notre travail et d'accepter la Présidence du Jury de cette thèse. Nous sommes heureux de lui exprimer notre très sincère reconnaissance.

Mademoiselle M. Faure nous a accueilli dans son laboratoire et nous a formé aux disciplines de l'immunologie. Pendant plus de dix années, ses conseils et ses critiques ont été pour nous une aide et un précieux encouragement. Qu'elle veuille trouver ici le témoignage de notre gratitude.

A Madame A. Ryter qui a assuré toute la partie de ce travail relative aux techniques de microscopie électronique et qui a contribué à l'interprétation des données anatomiques, nous n'exprimerons jamais assez notre reconnaissance. Sa collaboration a toujours été empreinte de la plus grande amabilité.

Le Docteur C. D. Ginger du National Institute for Medical Research (Londres) a bien voulu rechercher le glycosaminopeptide dans les fractions de tréponèmes que nous lui avons confiées. Nous l'en remercions vivement.

Le Docteur P. Dupouey a effectué les micromanipulations au cours de ce travail et nous avons eu avec lui de fructueuses discussions. Nous lui en sommes très reconnaissants.

Madame S. d'Azambuja, experte et dévouée, nous a apporté l'aide de sa collaboration technique. Nous sommes heureux de lui exprimer notre amicale gratitude.

Nous sommes reconnaissant à tout le personnel du laboratoire de Biochimie des Antigènes de l'aide qu'il nous a apportée.

Que Monsieur le Professeur Gernez-Rieux, Directeur de l'Institut Pasteur, et Monsieur le Docteur Marneffe, veuillent accepter ici le témoignage de notre respectueuse reconnaissance et de notre entier dévouement.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534905_0035

INTRODUCTION.

La première description d'organismes analogues à ceux qui portent actuellement le nom de spirochètes ou de *Spirochaetales* fut faite par Ehrenberg en 1833. Cet auteur observa des microorganismes hélicoïdaux qu'il dénomma spirilles lorsqu'il s'agissait de cellules rigides, spirochètes lorsqu'il s'agissait de cellules souples. Cette distinction fondamentale entre spirilles et spirochètes est encore valable de nos jours.

Si, actuellement, tous les auteurs sont d'accord pour considérer les spirilles comme des eubactéries, la position des *Spirochaetales* au sein des protistes n'est toujours pas clairement définie. Les auteurs ont envisagé les relations qui unissent les *Spirochaetales* aux autres microorganismes selon trois conceptions. Certains considèrent les *Spirochaetales* comme des bactéries, d'autres comme des protozoaires ; enfin un troisième groupe classe les *Spirochaetales* dans une catégorie intermédiaire entre les bactéries et les protozoaires. Cette dernière conception a prédominé ces dix années passées.

Ces divergences tiennent à un certain nombre de faits interprétés trop exclusivement à la lumière des préoccupations propres à la discipline de chaque auteur.

Au départ, le botaniste F. Cohn (1854) rapprochait les *Spirochaetales* des cyanophycées, c'est-à-dire des bactéries ; cette opinion tombait dans l'oubli à la suite de travaux conduits surtout par des zoologistes à la fin du dix-neuvième et au début du vingtième siècle.

En 1882, le zoologiste Certes décrivaient une « membrane ondulante » chez un microorganisme hélicoïdal de la tige cristalline de l'huître ; il dénommait alors ce microorganisme, *Trypanosoma balbianii*. En 1907, Borrel et Cernovodeanu, puis Fantham considéraient à juste titre *Trypanosoma balbianii* comme une *Spirochaetale* ; Schaudinn (1907) en déduisait que le filament axial des *Spirochaetales* est l'analogue de la membrane ondulante des trypanosomes. En même temps, Schaudinn (1907), impressionné par les stades de latence de la syphilis et les rémissions des fièvres récurrentes durant lesquels il ne retrouvait pas le microorganisme responsable, émettait l'hypothèse d'une phase granulaire « de repos » susceptible de redonner la forme hélicoïdale virulente. Cette hypothèse du cycle est encore acceptée de nos jours par la majorité des syphiligraphes. Ainsi, le classement des *Spirochaetales* avec les protozoaires était proposé d'après les seules données morphologiques ; un certain nombre de faits semblaient, secondairement, confirmer ce point de vue.

Des découvertes de Marchoux et Salimbeni (1903), de Sergent et Foley (1908), relatives aux rôles des arthropodes dans la transmission des *Spirochaetales* des fièvres récurrentes de la poule et de l'homme,

on retenait surtout l'analogie avec le mode de transmission de la trypanosomiase et du paludisme. En 1914, Charles Nicolle et Blanc croyaient déceler un cycle chez le pou, vecteur de l'agent d'une spirochétose humaine ; du même coup, l'hypothèse du cycle paraissait plus solidement établie. La découverte par Ehrlich (1911) puis Fourneau (1923) de l'activité des arsenicaux pour la thérapeutique des tréponématoses et des trypanosomiases, accentuait encore l'analogie entre les agents responsables de ces deux sortes d'affections. Enfin l'hypothèse d'une reproduction des *Spirochaetales* par division longitudinale, mise en avant par Von Prowazek dès 1907, est toujours invoquée pour classer des *Spirochaetales* avec les protistes supérieurs (Czekalowski, 1963).

C'est pour toutes ces raisons que, pendant la première moitié de ce siècle, les *Spirochaetales* furent le plus souvent considérées comme des protistes supérieurs et étudiées presque exclusivement par les protozoologistes.

Actuellement, dans la classification de Breed, Murray et Smith (Bergey's manual, 1957), les *Spirochaetales* constituent un ordre et sont classées avec les *Schizomycetes*. Prevot (1957), dans sa classification, reste très attaché à la position intermédiaire entre protistes supérieurs et inférieurs que l'on attribuait aux *Spirochaetales* et classe ces dernières dans un « sous-règne », les *Protozoobacteria*. Depuis ces classifications les conceptions n'ont guère varié ; Babudieri (1958) place les *Spirochaetales* dans une position intermédiaire « entre le règne végétal et le règne animal » ; van Thiel (1959) les situe plus près des protozoaires que des bactéries.

En plus de ces discussions où s'affrontent les préjugés des botanistes, des zoologistes et des médecins, un autre problème reste posé relatif à la nature unicellulaire ou pluricellulaire des *Spirochaetales* et en particulier des *Spirochaetales* géantes.

En 1901, Laveran et Mesnil, en colorant la *Spirochaetale* de l'huître décrite par Certes sous le nom de *Trypanosoma balbianii*, révélaient une striation transversale chez ce microorganisme. Les *Spirochaetales* géantes que l'on retrouvait chez d'autres mollusques étaient également striées. En 1912, Gross découvrait dans le sable des Foraminifères d'autres microorganismes hélicoïdaux, géants, pluricellulaires, sans « membrane ondulante » et les classait avec les *Spirochaetales* ; aux premiers il donnait le générique de *Cristispira*, aux seconds celui de *Saprospira*. Malgré Pettit (1928) qui voyait les *Spirochaetales* plutôt unicellulaires avec une structure alvéolaire, l'idée que certaines *Spirochaetales* pouvaient être pluricellulaires persista jusqu'à la dernière édition du Bergey's manual (1957).

Nous avons reconsidéré l'ensemble de ces problèmes dans le présent travail, avec l'intention :

1°. d'éclaircir les relations qui unissent les *Spirochaetales* aux protistes,

2°. de rechercher des caractères distinctifs précis entre les différents genres décrits chez les *Spirochaetales* d'une part, les différentes espèces décrites chez le genre *Treponema* d'autre part.

Pour cette étude nous avons utilisé essentiellement des critères anatomiques (morphologiques, cytochimiques...) et des critères antigéniques.

a) Les critères anatomiques ont toujours été largement utilisés pour la définition des groupes taxonomiques chez les animaux et les plantes. Chez les protistes inférieurs qui sont asexués et pour lesquels nous ne possédons pas d'individus fossiles, l'étude de la structure cellulaire externe et interne apporte d'emblée des renseignements importants pour une mise en ordre des différentes catégories. L'architecture cellulaire révélée par la microscopie électronique après contraste négatif (Brenner et Horne, 1959) ou sur des coupes minces (Ryter et Kellenberger, 1958), n'est que la traduction de certaines caractéristiques physico-chimiques du métabolisme de la cellule qui se reflètent dans l'agencement de ses macromolécules (Gunsalus et Stanier, 1960).

b) Les critères antigéniques tiennent à la structure propre de ces macromolécules.

La base chimique de la spécificité antigénique est solidement établie depuis Landsteiner (1936). L'information que l'on obtient par les méthodes immunologiques ne concerne qu'une partie très limitée de la surface moléculaire ; par exemple, dans le cas des dextranes, le site antigénique se combinant à l'anticorps ne dépasse pas six résidus glucose et il peut être plus petit (Kabat, 1958). On saisit ainsi la finesse du pouvoir discriminant des anticorps dans la reconnaissance des analogies de structure à la surface des macromolécules.

La recherche des communautés antigéniques est largement utilisée pour la mise en ordre des êtres vivants. Boyden (1962, 1963) a discuté les résultats de la confrontation des analogies biochimiques révélées par l'immunoprécipitation, aux autres données utilisables pour objectiver les relations au sein du monde animal. Cummins (1962) a passé en revue les études immunologiques effectuées dans le même but chez les bactéries. Il ressort de ces mémoires que les études immunologiques de systématique sont conduites le plus souvent avec un souci de simplicité, sans tenir compte des défaillances propres à chaque méthode immunologique.

En effet, l'union des structures complémentaires de l'antigène et de l'anticorps n'est pas toujours suivie d'une réaction visible. Ce fait tient soit à l'antigène (état physique), soit à l'anticorps (aptitude). Le seuil visible de la réaction en fonction de la quantité d'antigène à révéler (sensibilité) varie selon les techniques. Enfin, hormis l'immunoprécipitation en gel, les réactions immunologiques ne donnent aucune idée du nombre des systèmes antigène-anticorps impliqués dans la réaction (pouvoir analytique). Les possibilités et les limites des principales réactions immunologiques pour caractériser un antigène cellulaire sont comparées dans le tableau I.

Il s'ensuit que dans toute analyse immunologique systématique on doit compenser les inconvénients d'une méthode par les avantages d'une autre : par exemple l'immunofluorescence et l'immunoprécipitation en gel se complètent avantageusement.

TABLEAU I.

Possibilités et limites des principales réactions immunologiques pour révéler un antigène cellulaire (arbitrairement chiffrées de + à ++ ++).

	Etat physique de l'antigène	Aptitude de l'anticorps à donner une réaction visible	Sensibilité	Pouvoir analytique
Agglutination	insoluble	+++	++	0
Fixation du complément	soluble et insoluble	++	+++	0
Immuno-fluorescence	insoluble	++++	++++	0
Immuno-précipitation	soluble	+++	+	+++

En dehors de la composition en base de l'A.D.N. nous n'avons pas recherché d'autres informations sur la structure des macromolécules.

En ce qui concerne la physiologie des *Spirochaetales* nos connaissances sont encore trop rudimentaires pour être utilisables. A ce jour, les besoins élémentaires et énergétiques du seul tréponème de Reiter (Steinman, Oyama et Schulze, 1954) et du seul *Leptospira canicola* (Stalheim et Wilson, 1964) ont été complètement analysés. Ces besoins ne sauraient être pris en considération car, pour classer, il y a intérêt à ne pas tenir compte des besoins en facteur de croissance trop sujets aux mutations (Stanier, Doudoroff et Adelberg, 1958). Nous ne savons rien du mécanisme des biosynthèses chez les *Spirochaetales*. Aucune étude de transfert génétique n'a été réalisée ; le taux de croissance très faible des *Spirochaetales* (la division cellulaire demande 24 heures pour certains), la complexité des milieux qu'ils exigent et, pour les tréponèmes et borrelia, l'anaérobiose stricte, constituent de sérieux obstacles. Enfin, beaucoup de *Spirochaetales* ne sont pas cultivables (tréponème de la syphilis) et leur étude ne peut être qu'anatomique et partiellement antigénique.

Aussi cet essai de mise en ordre des *Spirochaetales* en général, et des tréponèmes en particulier, repose-t-il surtout sur des données directement utilisables, c'est-à-dire celles de l'anatomie et de l'immunologie.

Le plan que nous avons suivi dans la rédaction de ce travail est le suivant :

Au chapitre I nous décrivons le matériel et les techniques utilisés et notamment les méthodes de préparation des antigènes pour les différentes études antigéniques,

La structure anatomique est l'objet du chapitre II. Les *Spirochaetales* apparaissent constituées : d'une enveloppe externe, d'un corps cellulaire limité par une membrane, d'un noyau sans membrane limitante, d'un organe locomoteur interne (fibrilles ou axostyle) situé dans l'espace limité par l'enveloppe et la membrane.

La constitution antigénique est étudiée au chapitre III. Nous décelons des communautés antigéniques constantes au sein des tréponèmes ; les communautés ne s'étendent qu'aux *Spirochaetales* anatomiquement les plus proches des tréponèmes : les borrelia.

Le chapitre IV est consacré à l'étude des formes non hélicoïdales des tréponèmes et des autres *Spirochaetales*. Ces formes, considérées souvent comme les phases d'un hypothétique cycle, correspondent soit à une modification du profil cellulaire liée à un décollement de l'enveloppe externe du spirochète, soit à des phénomènes d'agglutination immunologique, soit à des produits d'autolyse.

Le chapitre V apporte des précisions sur l'ultrastructure du tréponème ; l'enveloppe et le corps cellulaire sont séparés et étudiés chimiquement et antigéniquement. Le glycosaminopeptide est localisé au niveau de la membrane limitant le cytoplasme (membrane pariéto-cytoplasmique).

Dans la discussion, les faits expérimentaux rapportés ici sont confrontés aux connaissances actuelles sur les protistes et les bactéries. L'originalité des *Spirochaetales* est précisée : elles apparaissent très proches des eubactéries à Gram négatif et s'en différencient surtout par la position de leur appareil locomoteur. Les caractéristiques des différents genres sont établies ; l'anatomie et l'immunologie permettent la distinction des genres, mais la discrimination des espèces au sein du genre *Treponema* ne peut être, d'après notre étude, qu'immunologique. Enfin une nouvelle classification des *Spirochaetales* est proposée.

CHAPITRE I.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

I. Souches et milieux de culture.

A) Souches cataloguées.

— Le tréponème de Reiter fut isolé d'une lésion syphilitique humaine. Reiter, en 1960, a discuté son origine. Ce tréponème n'est pas pathogène ; antigéniquement, il est très différent de *T. pallidum* (Pillot, Dupouey et Faure, 1960).

Le tréponème de Reiter doit avoir un nom, nous proposons de l'appeler *Treponema reiteri*. Nous verrons par la suite qu'il est très voisin ou identique à *T. phagedenis* mais dès maintenant il nous semble indispensable de lui donner un nom spécifique autonome.

Nous cultivons *T. reiteri* dans un milieu complexe de pH 7,6, additionné de 10 pour 100 de sérum, comme précédemment décrit (Pillot, 1962). *T. reiteri* est sans aucun doute un saprophyte isolé fortuitement.

— *T. phagedenis* et *T. minutum* proviennent de la collection de l'Institut Pasteur. Le premier est cultivé comme *T. reiteri* ; le second sur un milieu analogue, mais de pH 7.

— Nous devons *T. vincentii* à l'obligeance du Docteur Hanson d'Atlanta ; cette souche croît sur le milieu convenant à *T. minutum*, mais additionné de 25 µg/ml de chlorhydrate de thiamine et de 20 pour 100 de sérum de lapin frais.

— *T. pallidum*, souche Nichols, fut isolé en 1912 à partir du liquide céphalo-rachidien d'un malade atteint de neuro-syphilis. Il n'est pas cultivable *in vitro* ; il est entretenu sur le lapin par passage intratesticulaire. On extrait les tréponèmes des testicules, 8 à 10 jours après l'inoculation, selon la technique de Nelson (1949).

— *Borrelia hispanica* provient de l'Institut Pasteur d'Alger où elle fut isolée, il y a une trentaine d'années, d'une fièvre récurrente humaine. Elle est entretenue sur cobaye ; ses conditions de croissance *in vitro* ont été décrites (Pillot, Dupouey et Ryter, 1964).

— *Leptospira ictero-hemorrhagiae* (souche Verdun) appartient à la collection de l'Institut Pasteur ; nous la cultivons sur milieu de Stuart (1946).

B) Souches non cataloguées.

Elles proviennent de la tige cristalline des mollusques bivalves où l'on rencontre deux types de *Spirochaetales* de tailles très différentes.

Nous trouvons des *Spirochaetales* de petites dimensions, de taille analogue à celle des précédentes, dans la tige cristalline des mollusques bivalves suivants : *Solen marginatus, Ensis ensis, Cardium edule, Mya arenaria, Scrobicularia piperata.* Les *Spirochaetales* y sont souvent très abondantes, en culture pure ou associées à des bacilles (vibrions, spirilles). Parmi ces petites *Spirochaetales*, celle de *Scrobicularia piperata* a été la seule étudiée.

Les *Spirochaetales* géantes ou cristispires étudiées ici sont celles de la tige cristalline des *Tapes* (*T. decussatus, T. aureus, T. pullastra*). Cette flore est constante chez pratiquement tous les mollusques examinés. Elles proviennent de deux zones géographiquement distinctes du littoral atlantique ; Roscoff (Finistère), Préfailles (Loire-Atlantique).

Ces *Spirochaetales* de mollusques ne sont plus observées chez les animaux soustraits de leur milieu naturel depuis plus de 48 heures ; la tige cristalline disparaît avec le jeûne du mollusque d'autant plus rapidement que la température est plus élevée.

Nous avons tenté la culture des cristispires sur les milieux mentionnés ci-dessus assurant la croissance des tréponèmes, des borrelia et des leptospires. Ces milieux ont été solidifiés soit par la gélose à 8 pour 1000 (une concentration supérieure est inhibitrice pour les *Spirochaetales*), soit par la gélatine à 25 pour 100 compte tenu du fait que la tige cristalline est un gel surtout protéique (Bailey et Worboys, 1960). Nous avons eu également recours au milieu de Veldkamp (1960) qui avait permis à cet auteur l'isolement d'une *Spirochaetale* de la vase. Nous avons essayé, en eau de mer, les formules utilisées pour la croissance des cellules en virologie : liquide de Hanks, milieux à la caséine, à la lactalbumine, milieu synthétique de Parker. Tous les milieux ont été ensemencés en présence de 100 µg/ml de néomycine (elle est inactive sur les *Spirochaetales*) pour inhiber les contaminants, ou sans néomycine pour profiter d'une éventuelle symbiose. Comme inoculum, nous avons utilisé soit des fragments de tige cristalline, soit le produit de dissolution de cette dernière dans l'eau de mer. En effet la tige cristalline s'y dissout en quelques heures ; si l'on prend soin d'éliminer l'extrémité antérieure, gastrique, de la tige cristalline qui libère une substance toxique pour les cristispires et si l'on opère à une température inférieure à +6°C (Berkeley, 1959), la plupart des cristispires libérées conservent leur mobilité pendant 24 à 48 heures. L'inoculation a été effectuée soit dans le milieu liquide maintenu à une température voisine de celle de la prise en masse, soit par piqûre centrale du milieu solidifié et refroidi à 15°C. La température d'incubation a varié de 15°C à 37°C ; les cultures ont été observées pendant un mois.

Tous les essais ont été négatifs, hormis un résultat partiel avec les formules de Hanks et de Parker. Les cristispires se multiplient faiblement dans les tiges cristallines incluses dans ces deux milieux s'ils sont préservés des contaminations par la néomycine et incubés à 15°C. Les cristispires ne diffusent pas au-delà du fragment de tige ; une fois la multiplication terminée, elles se lysent rapidement.

Comme milieu d'étude des cristispires, nous avons préféré recourir aux tiges cristallines prélevées extemporanément chez le mollusque.

II. Les procédés d'observation.

A) L'observation à l'état frais a été faite au microscope à fond noir, au microscope à contraste de phase et au microscope interférentiel ; dans certains cas elle fut asociée à la micromanipulation (micromanipulateur de DE FONBRUNE).

B) Techniques de microscopie électronique.

1) CONTRASTE NÉGATIF.

Les préparations à l'acide phosphotungstique sont faites en mélangeant à parties égales l'acide phosphotungstique à 4 % neutralisé à pH 7,0, avec la culture de *Spirochaetales*, ou dans le cas de *T. pallidum* avec le liquide d'extraction des testicules. Selon les souches et le milieu de culture utilisés ce mélange provoque des précipitations très gênantes, mais du fait de la fragilité de ces microorganismes, il n'est pas possible de les placer dans des solutions salines sans altérer gravement leur structure.

2) COUPES MINCES.

Pour la fixation, les *Spirochaetales* centrifugées sont reprises directement dans le tétraoxyde d'osmium à 1 pour 100 et à pH 6, selon la formule de RYTER et KELLENBERGER (1958). La grande fragilité de *L. ictero-hemorrhagiae* ne permettant pas de le centrifuger sans altération, nous avons dû recourir à la filtration de la culture sur membrane de cellophane ; la membrane est fixée comme précédemment. Les essais d'isolement de *T. pallidum* à partir de testicules de lapins infectés et des *Spirochaetales* de mollusques à partir des tiges cristallines, n'ayant pas donné satisfaction, la fixation de ces *Spirochaetales* est pratiqué *in situ* ; les fragments de testicule ou de tige cristalline sont fixés dans de l'acide osmique à pH 6, comme pour la fixation des autres *Spirochaetales*.

Après une nuit de fixation les *Spirochaetales* libres ou leur support sont centrifugés et repris dans un peu d'agar, traités par l'acétate d'uranyle à 0,5 pour 100 pendant deux heures, puis déshydratés et inclus dans du vestopal. Les coupes sont généralement contrastées aux sels de plomb ou à l'acétate d'uranyle ou au nitrate de lanthane.

Pour différencier le matériel nucléaire de celui des inclusions, le traitement à l'acétate d'uranyle a été remplacé par celui au versène à 1 pour 100, en tampon de MICHAELIS de pH 6 (KELLENBERGER et RYTER, 1964).

III. Les techniques biochimiques (*).

Les enzymes ont été habituellement utilisés à des concentrations de 100 à 250 µg/ml pour des poids secs de tréponèmes ou de fractions tréponémiques de l'ordre de 1 mg/ml en tampon phosphate 0,01 M de

(*) Les techniques classiques, pour lesquelles nous ne mentionnons pas de références bibliographiques, sont décrites dans l'ouvrage de LOISELEUR (1963).

pH 7,4. Le versène a été utilisé aux concentrations de 1 à 2,5 mg pour 1 mg de poids sec de tréponèmes ou de fractions tréponémiques en tampon carbonate-bicarbonate 0,5 M de pH 9. Le suc gastrique de l'escargot est ajouté, sous un volume correspondant environ au 1/5 du volume de la suspension de tréponèmes (1 mg/ml) à traiter. L'incubation est maintenue 2 à 12 h à 37°. L'azote est dosé selon la méthode de Kjeldhal. Les protéines sont dosées selon la méthode de Lowry ; la méthode classique laissant un résidu insoluble, nous reprenons le produit à doser par la soude et nous chauffons 10 minutes au bain-marie bouillant. Le phosphore (minéral et organique) est dosé par la méthode de Fiske et Subbarow, les oses par la méthode à l'orcinol.

Les lipides sont extraits par un mélange d'éthanol, 1 volume, et d'éther, 2 volumes, puis par un mélange méthanol, 1 volume, éther, 2 volumes ; la masse cellulaire est broyée dans ces solvants à l'aide d'un mixer (ultra-turax). Les extraits sont réunis et évaporés à sec sous le vide ; les lipides sont séparés des substances non lipidiques extraites, par la méthode précédemment décrite (Faure et Pillot, 1960), puis ils sont pesés. Les phosphatides sont séparés et fractionnés par chromatographie sur une colonne d'acide silicique ; chacune des fractions obtenues est analysée par chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique, les taches étant révélées par les colorations suivantes : rhodamine, réactif du phosphore, ninhydrine et acide osmique.

Acide nucléique total, A.R.N. et A.D.N. sont extraits et dosés selon Ogur et Rosen ; l'absorption à 2800 Å étant supérieure à la moitié de l'absorption à 2600 Å du fait de la présence d'amino-acides dans nos préparations, nous avons eu recours à une abaque construite selon Warburg et Christian (1942) pour exprimer nos résultats.

L'A.D.N. est caractérisé par le réactif à la diphénylamine. Le pourcentage des bases de l'A.D.N. est déterminé selon la technique décrite par Sebald et Veron (1963).

Le glycosaminopeptide est fractionné selon la méthode de Cummins et Harris, puis dosé par le test d'Elson et Morgan, dans les conditions décrites par Perkins et Allison (1963).

IV. Les techniques immunologiques.

A) La préparation des immunsérums.

Le protocole d'immunisation des lapins antitréponèmes de culture et antileptospires a été précédemment décrit (Pillot, Dupouey et Faure, 1960 ; Pillot et d'Azambuja, 1963). Comme immunsérum anti-*T. pallidum*, nous utilisons des sérums de lapins syphilisés depuis 3 à 6 mois.

Etant donné le faible rendement des cultures, l'immunisation anti-*B. hispanica* a été effectuée en présence d'alun de potassium comme adjuvant. Une primo-culture de 4 jours ensemencée à partir du sang de cobaye infecté (Pillot, Dupouey et Ryter, 1964), est centrifugée à + 4° pendant 10 minutes à 1000 g pour faire sédimenter les hématies que l'on élimine. Les borrelia sont centrifugées du précédent surna-

geant, à 10.000 g pendant une heure. Le culot repris dans un volume d'eau égal au 1/500 du volume de la culture, est additionné d'un volume égal d'alun de potassium à 2 pour 100 et injecté au lapin selon le protocole habituel.

Parallèlement aux immunsérums de lapin nous avons utilisé, dans la mesure de nos disponibilités, des sérums humains provenant de sujets atteints d'infections à *Spirochaetales*.

Pour l'immunofluorescence, les sérums antiglobulines de lapin sont obtenus chez le canard ou le mouton, les sérums antiglobulines humaines, chez le lapin. Ces sérums ont été conjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine selon la technique classique avec purification sur colonne de sephadex ; ils sont marqués avec six molécules de fluorescéine par molécule d'anticorps (Pillot et Daguet, 1965).

B) Le problème de la réactivité *in vitro* des antigènes des *Spirochaetales*. Les modalités techniques (*).

Pour la recherche des communautés antigéniques entre les *Spirochaetales* nous avons mis en œuvre les quatre techniques présentées dans l'Introduction : agglutination, fixation du complément, immunofluorescence et immunoprécipitation en gel.

Le souci de mettre en évidence le plus grand nombre possible d'antigènes pose des problèmes propres à certaines *Spirochaetales* et à chaque technique utilisée.

1) La réaction d'agglutination.

Avec les tréponèmes de culture et les borellia, elle est effectuée sur des cellules en phase exponentielle de croissance, centrifugées et remises en suspension en eau physiologique de façon à obtenir une densité optique d'environ 0,40 avec une longueur d'onde de 400 mμ. Lavage et macération prolongée sont évités pour prévenir la perte d'antigènes superficiels éventuellement labiles.

T. pallidum fraîchement extrait dans le milieu de survie de Nelson n'est pas agglutiné par l'immunsérum correspondant. Ce tréponème ne devient agglutinable qu'après chauffage, en opérant selon Hardy et Nell (1957). Puisque les leptospires sont lysés en présence de l'immunsérum, nous fixons les cellules et nous opérons selon la méthode préconisée par Galton (1958).

Toutes ces réactions sont effectuées en tubes, avec des volumes égaux de suspension cellulaire et de sérum dilué de 1/3 en 1/3 à partir d'une dilution initiale à 1/10 ; sauf pour *T. pallidum*, pour lequel la réaction est prolongée à froid, les réactions sont incubées 2 heures au bain-marie à 37° et la lecture est effectuée après 1/2 heure de séjour à la température du laboratoire.

2) La réaction de fixation du complément.

Les tréponèmes en croissance, fraîchement récoltés, non lavés, ne fixent le complément qu'en présence de l'immunsérum homologue. Si on les lave en solution tamponnée faiblement alcaline (pH 7,2 - 8), ou

---

(*) Les techniques classiques, pour lesquelles nous ne mentionnons pas de références bibliographiques, sont décrites dans l'ouvrage d'Olivier (1963).

mieux si on les broie, l'activité antigénique homologue croît, en même temps qu'apparaît une activité antigénique hétérologue. Ainsi les cellules non lavées, intactes, de *T. reiteri,* ne réagissent qu'avec l'immunsérum anti-*T. reiteri* ; après un lavage et surtout un broyage, ces cellules réagissent pratiquement avec tous les sérums anti-tréponèmes. Nous en déduisons donc que le revêtement des cellules de *T. reiteri* est imperméable aux anticorps et que tous les antigènes cellulaires ne peuvent être révélés qu'après dispersion des constituants de la cellule. Nous avons comparé le broyage mécanique (billes d'acier), les congélations et décongélations successives, l'ultrasonnation à différentes fréquences (Pillot et Faure, 1959). L'ultrasonnation s'avère le procédé le plus efficace pour accroître l'activité antigénique des préparations vis-à-vis du sérum homologue et faire apparaître l'activité vis-à-vis des sérums hétérologues. L'ultrasonnation ne semble pas dénaturer les diverses activités antigéniques, car l'épuisement d'un sérum anti-*T. reiteri* par un ultrasonnat de ce même tréponème enlève au sérum son activité vis-à-vis des suspensions de tréponèmes intacts ou lavés.

Ces constatations, jointes au fait que nous décelons très tôt des antigènes en solution dans le milieu de culture, dès la fin de la phase exponentielle de croissance, nous ont conduit à n'utiliser que des *Spirochaetales* récoltées suffisamment tôt, non lavées pour ne pas risquer de perdre des antigènes, et à vérifier éventuellement par des témoins l'absence de réaction avec les constituants du milieu de culture. Pour démasquer tous les antigènes, nous broyons par les ultrasons les *Spirochaetales* en tampon véronal de pH 8,0 0,1 M ; nous opérons à une fréquence de 18,6 kilocycles, d'autant plus longtemps que le volume à traiter est plus grand (5 à 30 minutes pour des volumes de 5 à 100 ml), sous un courant d'H_2 et en immergeant la préparation dans la glace fondante.

Nous pratiquons la méthode de fixation du complément de Kolmer. Chaque ultrasonnat de *Spirochaetales* est titré vis-à-vis de l'immunsérum homologue pour préciser son optimum antigénique. Les immunsérums de lapins sont utilisés à une dilution initiale de 1/10 ; les sérums humains sont utilisés sans dilution préalable. On réalise ensuite une série de dilutions de 1/3 en 1/3.

3) La réaction d'immunofluorescence.

Les tréponèmes et les borrelia sont centrifugés de leur milieu et repris en eau physiologique ; la préparation des suspensions de *T. pallidum,* du tréponème de *Scrobicularia piperata* (*), de *B. hispanica,* requiert une centrifugation préalable à 1000 g pour éliminer toutes sortes de débris qui accompagnent ces *Spirochaetales. L. icterohemorrhagiae,* très fragile, est soit étalée avec son milieu de culture, soit, ce qui est préférable, centrifugée à + 4° et reprise dans du

(*) Le tréponème de *Scrobicularia piperata* est obtenu par dissolution des tiges cristallines en eau physiologique, à + 4°.

milieu de Stuart sans sérum. En ce qui concerne les cristispires, nous avons eu beaucoup de difficultés à prévenir leur lyse ; les meilleurs résultats ont été obtenus en réalisant des frottis de tiges cristallines particulièrement riches en cristispires sur des lames maintenues à 0°, et en fixant rapidement à cette température. Les frottis sont préparés juste avant leur emploi. Nous les fixons 10 minutes par l'acétone. Des fixateurs plus efficaces, comme l'acide osmique ou le réactif de Carnoy, n'ont pu être utilisés ici car ils se sont avérés dénaturants pour certains antigènes des *Spirochaetales*.

Nous utilisons la technique d'immunofluorescence indirecte. Pour cette réaction les sérums anti-*Spirochaetales* sont dilués initialement à 1/10 puis de là, dilués de 1/3 en 1/3. L'optimum d'utilisation des sérums antiglobulines conjugués a été déterminé pour chaque *Spirochaetale ;* pour un conjugué donné, cet optimum s'est avéré pratiquement le même tant pour les réactions homologues qu'hétérologues. Le conjugué antiglobulines de lapin préparé à partir du sérum de canard colore spontanément les borrelia ; afin de surmonter cette difficulté, nous avons utilisé pour les borrelia un conjugué antiglobulines de lapin, provenant du mouton.

4) L'immunoprécipitation en gel.

Cette réaction pose le problème de la solubilisation des constituants cellulaires et de leur diffusion.

Compte tenu de la labilité de certains constituants qui diffusent dans le milieu, nous avons utilisé des *Spirochaetales* récoltées en phase exponentielle de croissance et non lavées. Nous avons comparé le simple ultrasonnat à pH 8 avec le produit de deux séries de techniques d'extraction visant à la solubilisation des constituants protéiques d'une part, des constituants polyosidiques d'autre part.

Ces travaux ont été conduits sur *T. reiteri*, en confrontant les résultats de la fixation du complément et de l'immunoprécipitation en gel.

a) La technique de diffusion en gel.

Le nombre de systèmes immunologiques individualisés dans les simples ultrasonnats de tréponèmes est inversement proportionnel à la concentration en gélose du milieu de diffusion. Certains constituants antigéniques ne sont que polydispersés et, de ce fait, ne sont pas révélés avec les techniques comportant les classiques concentrations en gélose de 1,2 à 1,5 pour 100. Le plus grand nombre de systèmes est obtenu avec la double diffusion en cuves minces, selon Oudin (1955), en utilisant une concentration de gélose de 0,6 pour 100.

Pour la réalisation des cuves, la gélose concentrée à 1,8 pour 100 est diluée au tiers dans la préparation antigénique centrifugée à 10.000 g. Nous obtenons une meilleure résolution des systèmes précipitants en étudiant les préparations antigéniques à plusieurs concentrations ; les concentrations maximales que nous utilisons sont, avant centrifugation, de l'ordre de 30 mg/ml (poids sec), les concentrations les plus faibles de l'ordre de 2 mg/ml.

b) L'extraction et la solubilisation des protéines. (Pillot et Faure, 1959 ; Pillot, Dupouey et Faure, 1960).

Comme témoin de cette extraction, nous suivons l'activité antigénique des préparations de *T. reiteri* vis-à-vis du sérum de sujet syphilitique. En effet, ce sérum donne une réaction hétérologue avec *T. reiteri* grâce à la présence d'un antigène de nature protéique (d'Alessandro et Dardanoni, 1953), commun à *T. reiteri* et à *T. pallidum*, et que nous dénommons protéine de groupe. Pour obtenir le meilleur rendement en cet antigène protéique, nous avons été conduits à appliquer aux tréponèmes les traitements successifs suivants : délipidation par le butanol saturé d'eau en milieu alcalin (pH 8), ultrasonnation à pH 9, neutralisation et centrifugation. Le surnageant est recueilli.

c) L'extraction et la solubilisation des polyosides. (Pillot et Dupouey, 1964).

Des essais préliminaires ayant montré que certains antigènes thermostables se révélaient étroitement associés à des protéines, nous avons détruit les fractions protéiques pour libérer ces antigènes. Dans ce but nous avons comparé le chauffage à 120°, l'alcalinité à des pH allant de 10 à 12,5, l'ultrasonnation à ces mêmes pH, l'action d'enzymes protéolytiques (pepsine, papaïne). Pour supprimer toute trace d'activité protéique de groupe, il s'est avéré nécessaire de faire subir successivement aux tréponèmes : une ultrasonnation à pH 11,5, un traitement par la papaïne et un chauffage à 120°. Après centrifugation à 10.000 g, on recueille le surnageant. Cette méthode d'extraction des polyosides nous a donné des rendements qualitatifs et quantitatifs supérieurs aux méthodes classiques d'extraction par le phénol, la formamide ou l'éthylène glycol.

d) La comparaison des résultats. Conclusion.

Par la technique de précipitation en gel, l'analyse comparative du simple ultrasonnat, de l'extrait protéique et de l'extrait polyosidique, montre que tous les antigènes présents dans les deux extraits se retrouvent dans l'ultrasonnat. Tout au plus, avec les extraits, certaines raies de précipitation se situent plus loin de la source d'antigène qu'avec l'ultrasonnat, pour le même poids de tréponèmes au départ ; ce fait témoigne d'un meilleur rendement ou d'une diffusibilité supérieure des différents antigènes dans les extraits. Par contre, nous ne retrouvons certains antigènes que dans l'ultrasonnat ; il est vraisemblable qu'ils ont été plus ou moins dénaturés au cours de l'extraction. Pour une solubilisation optimale des constituants cellulaires des *Spirochaetales*, nous n'avons donc finalement retenu que la seule ultrasonnation.

CHAPITRE II.

STRUCTURE ANATOMIQUE DES *SPIROCHAETALES* AU MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE.

I. Etude en contraste négatif.

Toutes les *Spirochaetales* se présentent sous une forme généralement sinueuse consécutive à l'aplatissement de l'hélice sur le film au moment de la préparation.

a) Les cinq tréponèmes (*T. reiteri, T. minutum, T. pallidum, T. phagedenis, T. vincentii*) étudiés par cette technique ont une morphologie très voisine.

Comme organe locomoteur, les tréponèmes possèdent une faisceau de fibrilles disposées parallèlement qui s'insèrent aux deux extrémités de la cellule par l'intermédiaire d'un granule à la base de chaque

---

Fig. 1. — *T. reiteri* observé par la méthode du contraste négatif. On distingue un granule au lieu d'insertion de certaines fibrilles et l'empreinte (em) que les fibrilles laissent sur le cytoplasme après leur rupture et leur déplacement. Les formations arrondies en bordure de la cellule sont des boursouflures (b) du revêtement cellulaire externe (enveloppe). Gr : 50.000.

Fig. 2. — Coupes de *T. reiteri*. On distingue à l'intérieur des concavités décrites par la cellule, coupée longitudinalement, des fibrilles (f) situées entre l'enveloppe (e) et la membrane limitant le cytoplasme (m). Dans la coupe transversale de la même figure, 4 fibrilles sont bien visibles. On note à plusieurs endroits du cytoplasme des structures lamellaires (ms) qui prennent naissance au niveau de la membrane. Le noyau (n) correspond aux zones claires, filamenteuses et très mal délimitées au sein du cytoplasme. Gr : 100.000.

Fig. 3. — *T. reiteri* observé par la méthode du contraste négatif. Les cellules sont disposées bout à bout et recouvertes par une enveloppe commune. Gr : 22.000.

Fig. 4. — Contraste négatif. *T. pallidum* montrant 3 fibrilles fixées en position subterminale. L'extrémité du corps cellulaire est très effilée. Gr : 70.000.

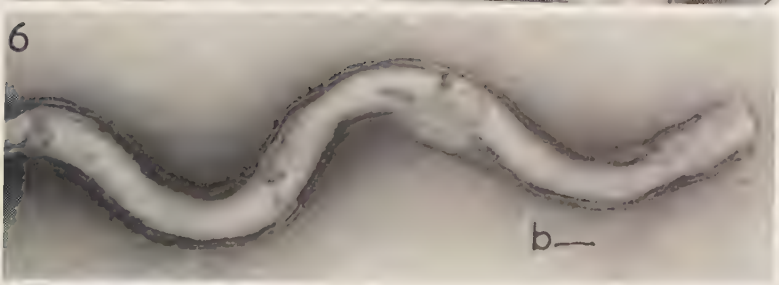
Fig. 5. — Contraste négatif. *T. vincentii* portant 6 fibrilles enroulées autour du corps cellulaire dont les extrémités sont beaucoup plus arrondies que chez *T. pallidum*. Gr : 40.000.

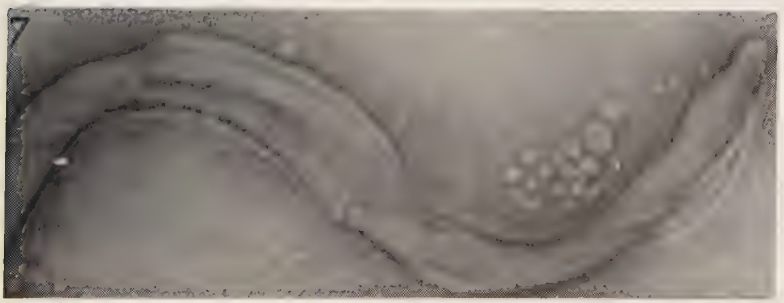
Fig. 6. — Contraste négatif. *T. phagedenis* montrant 6 fibrilles et présentant d'abondantes boursouflures de l'enveloppe (b). On distingue des sortes de replis cytoplasmiques le long du corps cellulaire qui sont probablement des altérations dues à la technique. Gr : 48.000.

Fig. 7. — Contraste négatif. *T. minutum* portant 3 fibrilles fixées tout près de l'extrémité du germe. Les gonflements du corps cellulaire correspondent à des lyses locales du cytoplasme. Gr : 61.000.

b
em
1
ms
f
n
ms
n
m
f
e
2
3

4
5


6
b


7

fibrille ; avant son insertion la fibrille dessine une angulation qui correspond sans doute au franchissement de la paroi (fig. 1, fig. 5, fig. 6, fig. 7). Les fibrilles ont toutes un même diamètre d'environ 170 Å, et ne montrent aucune structure particulière. Le faisceau de fibrilles est enroulé en hélice autour de la cellule ; les ombrages antérieurement effectués par d'autres auteurs (Swain, 1955 ; Veldkamp, 1960) montrent que les fibrilles tournent en sens contraire de la cellule, mais avec le même pas de vis. Dans certaines conditions, en particulier lorsque les tréponèmes ont été altérés, le faisceau de fibrilles peut se libérer ; il apparaît alors sous la forme de deux bouquets de flagelles subterminaux, tandis que l'empreinte laissée par les fibrilles sur le corps du tréponème peut être suivie d'une extrémité à l'autre de la cellule (fig. 1).

Le revêtement le plus externe que nous dénommerons enveloppe, pour des raisons exposées plus loin (chapitre V), forme souvent des boursouflures (fig. 1, fig. 3, fig. 6). Le cytoplasme présente aussi des replis qui sont vraisemblablement des artefacts dus à des lyses locales (fig. 6, fig. 7). L'examen de tréponèmes prélevés dans des conditions où la croissance est maximale montre l'existence de formes très longues correspondant à plusieurs cellules incluses bout à bout dans une même enveloppe (fig. 3). La division de l'enveloppe qui aboutit à la séparation complète des cellules n'est donc pas rigoureusement synchrone de la division cellulaire lorsque la croissance est très rapide.

Les cinq souches représentant cinq espèces de tréponèmes ne diffèrent morphologiquement que par le nombre de fibrilles, par le diamètre du corps cellulaire et par la forme plus ou moins effilée des extrémités.

Le nombre des fibrilles observé chez différents individus d'une même espèce peut varier de quelques unités d'un individu à l'autre ; nous observons parfois de faibles variations du nombre des fibrilles entre les deux extrémités d'une même cellule. Nous pensons que ces variations tiennent à l'écartement de certaines fibrilles lors de la préparation (fig. 1). Cette réserve faite, les variations du nombre maximum de fibrilles observé sont incontestables. *T. minutum* montre au maximum la présence de 3 fibrilles, *T. pallidum* en montre 4, *T. phagedenis* et *T. vincentii* en présentent 6, *T. reiteri* en présente jusqu'à 7. Le diamètre du corps cellulaire varie de 0,11 µ pour *T. minutum,* le plus petit des tréponèmes, à 0,25 µ pour *T. reiteri,* le plus volumineux. Le nombre de fibrilles et le diamètre du corps cellulaire croissent parallèlement mais le diamètre de l'unité fibrillaire demeure constant.

Les extrémités des cellules sont arrondies, excepté chez *T. pallidum* qui présente des extrémités très effilées, avec dans leur partie terminale, une zone plus dense que le reste du cytoplasme (fig. 4).

b) Dans son ensemble la morphologie de *B. hispanica* est un peu différente de celle des tréponèmes. *B. hispanica* est plus volumineuse ; son diamètre est de l'ordre de 0,34 µ. Elle se distingue des tréponèmes surtout par un nombre nettement plus élevé de fibrilles (une quinzaine) ; le diamètre de ces dernières, de 170 Å, est le même que celui des fibrilles de tréponèmes (fig. 11).

c) Quant à *L. ictero-hemorrhagiae*, elle se distingue des tréponèmes et des borrelia, par un aspect plus effilé de la cellule, par un pas de vis beaucoup plus serré, enfin par la présence d'un axostyle unique qui remplace le faisceau de fibrilles. L'axostyle a un diamètre de 250 Å ; il ne présente pas la disposition hélicoïdale mais constitue un axe, rectiligne ou curviligne, autour duquel le corps cellulaire est enroulé en hélice (fig. 15). L'axostyle est généralement invisible (fig. 14) ; on ne le voit nettement que si l'enveloppe externe de la leptospire est décollée du corps cellulaire (fig. 15). On y observe, plus souvent que chez les tréponèmes, des boursouflures de l'enveloppe et, très fréquemment, des formations bulleuses le plus souvent terminales ou subterminales ; celles-ci s'intriquent souvent les unes dans les autres ou se superposent les unes aux autres (fig. 14).

II. Etude en coupes minces.

Les *Spirochaetales* présentent une analogie de structure que l'on peut schématiser comme suit :

— en surface, on note l'existence d'une enveloppe ; par ses caractères que nous discuterons au chapitre V, cette enveloppe est différente de la capsule et de la paroi qui constituent le revêtement le plus externe des bactéries.

Fig. 8. — Coupe de testicule de lapin infecté par *T. pallidum*. Dans une coupe, sur la droite, on note l'existence de 3 fibrilles (f) sous l'enveloppe.

Fig. 9. — Coupes de *T. pallidum* dans le cytoplasme duquel on distingue des zones claires filamenteuses très mal délimitées et dispersées correspondant au noyau. La structure lamellaire est formée par l'invagination de la membrane et est donc l'équivalent d'un mésosome (ms). L'enveloppe adhère étroitement à la membrane. Gr : 120.000.

Fig. 10. — Coupe du petit tréponème de la tige cristalline du mollusque *Scrobicularia piperata*. L'enveloppe est souvent très lâche et onduleuse. Les zones peu denses que l'on trouve en grand nombre dans le cytoplasme semblent être de deux sortes : les unes, en général petites et mal délimitées, offrent l'aspect filamenteux typique du noyau (n), les autres, souvent assez importantes, sont constituées par une matière spongieuse plus grossière. Gr : 30.000.

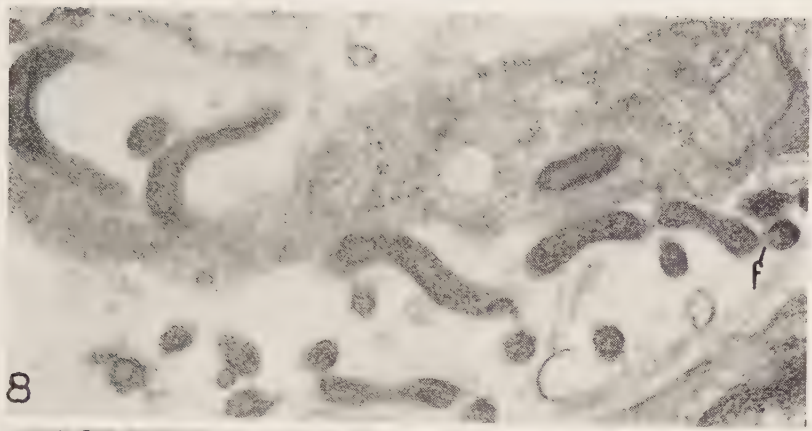
Fig. 11. — *B. hispanica* observée par la technique du contraste négatif. On distingue de nombreuses fibrilles dont quelques unes sont rompues. Gr : 35.000.

Fig. 12. — Coupe de *B. hispanica*. Le cytoplasme assez lâche contient des structures lamellaires correspondant aux mésosomes (ms). Le noyau (n) apparaît sous l'aspect de zones filamenteuses très mal délimitées. Les fibrilles (f) situées entre l'enveloppe et la membrane limitant le cytoplasme sont visibles par endroits. Gr : 46.000.

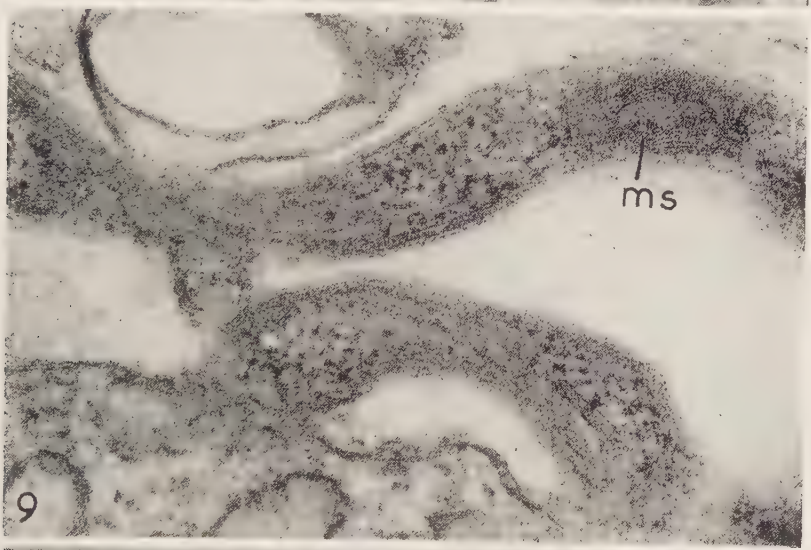
Fig. 13. — Coupe transversale de *B. hispanica* où la localisation des fibrilles (f) apparaît clairement. Gr : 46.000.

Fig. 14. — *L. ictero-hemorrhagiae* observée par la méthode du contraste négatif. L'axostyle est généralement invisible. Les formations arrondies ne sont pas des artéfacts mais correspondent à des formations bulleuses formées à partir de l'enveloppe. Gr : 40.000.

Fig. 15. — *L. ictero-hemorrhagiae* en contraste négatif, le décollement de l'enveloppe et ses boursouflures par endroits permettent de distinguer l'axostyle. Gr : 40.000.



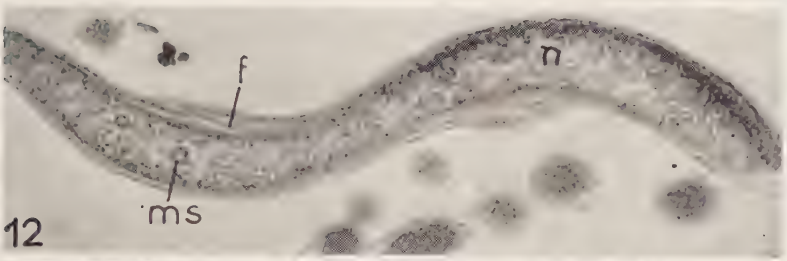
8



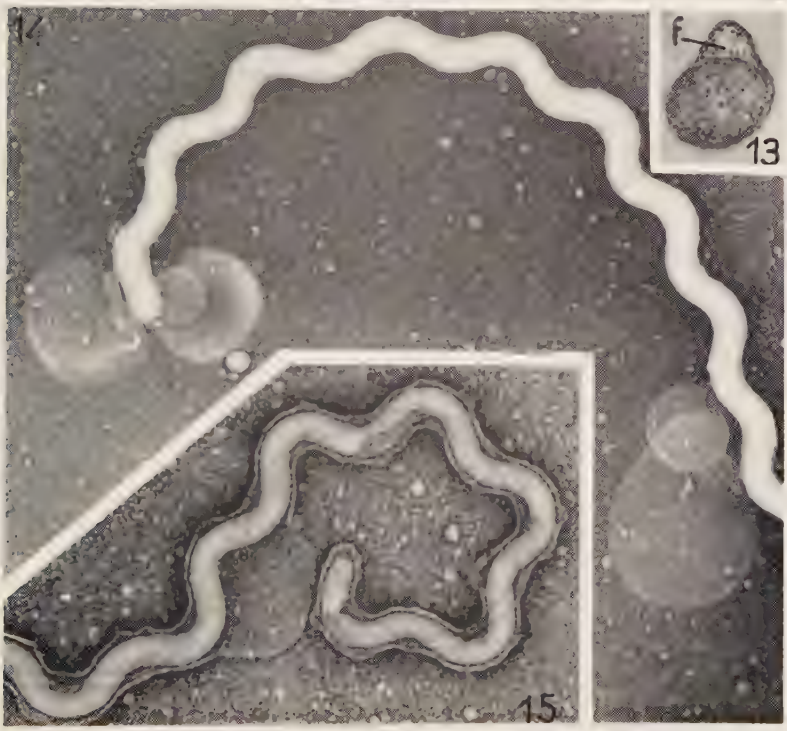
9

10

11



12



— le corps cellulaire, limité par une membrane relativement résistante, est constitué par le cytoplasme et son noyau. Il est cylindrique sur les coupes transversales ; sur les coupes longitudinales on constate son enroulement en hélice.

— fait très caractéristique de ce groupe de microorganismes, l'organe locomoteur est interne, situé entre l'enveloppe et le corps cellulaire.

a) Quatre tréponèmes ont été étudiés par cette méthode : *T. reiteri*, *T. minutum*, *T. pallidum* et le tréponème de la tige cristalline de *Scrobicularia piperata*.

L'enveloppe est toujours constituée de 3 feuillets ; ses dimensions sont identiques chez les 4 espèces : elle mesure au total 100 à 120 Å d'épaisseur. Elle présente surtout chez *T. minutum* (fig. 16) et chez le tréponème du mollusque (fig. 10) de nombreux décollements et ondulations ; chez *T. pallidum* elle est beaucoup plus ajustée au corps cellulaire et adhère étroitement à la membrane sous-jacente (fig. 8, fig. 9).

Le cytoplasme est limité par une membrane constituée de 3 feuillets offrant le même aspect que la membrane cytoplasmique des bactéries à Gram négatif. Cette membrane cytoplasmique semble être double à certains endroits.

Le cytoplasme est constitué de grains, dont certains particulièrement bien délimités et bien contrastés par le plomb mesurent 150 à 250 Å de diamètre ; ils correspondent aux ribosomes. De plus dans le cytoplasme, on distingue des structures lamellaires formées par la membrane et qui sont l'équivalent des mésosomes.

Le noyau se présente sous l'aspect de zones irrégulières et mal délimitées, constituées de fins filaments. Sur les coupes longitudinales, ces zones sont de forme allongée ; sur les coupes transversales, elles occupent généralement une position centrale et ont une forme arrondie. On observe ces zones filamenteuses sur la grande majorité des coupes longitudinales et transversales ; ce fait suggère que le noyau s'étend sans discontinuité d'une extrémité à l'autre du tréponème. Aucune membrane ne sépare le noyau du cytoplasme. Le tréponème de la tige cristalline présente, en plus des vacuoles nucléaires constituées de fins filaments, des inclusions constituées d'une matière spongieuse assez grossière (fig. 10).

Les coupes transversales montrent clairement que le faisceau de fibrilles est situé sous l'enveloppe, dans l'interstice limité par celle-ci et la membrane entourant le cytoplasme (fig. 2, fig. 8, fig. 17).

b) *B. hispanica* ne se distingue des tréponèmes que par les caractéristiques déjà mentionnées dans les images avec contraste négatif : dimensions plus grandes de la cellule, nombre de fibrilles plus élevé. On voit avec plus de facilité un noyau très dispersé, de forme allongée, et des structures lamellaires formées très probablement par des invaginations de la membrane (fig. 12). Les nombreuses fibrilles (une quinzaine) sont situées entre la membrane et l'enveloppe (fig. 13).

c) Avec les cristispires dont les grandes dimensions (50 à 100 µ de longueur, 2 à 3 µ de diamètre, jusqu'à 300 μ^3 de volume) facilitent l'observation, nous retrouvons l'architecture cellulaire typique des *Spirochaetales* (fig. 21).

L'enveloppe, toujours constituée de 3 feuillets, forme par endroits de nombreux replis, ce qui témoigne d'une grande souplesse (fig. 23, fig. 25).

Le cytoplasme dense et granulaire est limité par une membrane analogue à la membrane cytoplasmique des bactéries (fig. 22, fig. 24). Il contient deux types de zones « claires » : les plus volumineuses, de forme généralement arrondie et constituées d'une substance spongieuse peu dense aux électrons, les plus petites et les plus nombreuses, de forme très irrégulière et remplies d'un matériel fibrillaire assez lâche (fig. 21).

Les essais de coloration aux sels de plomb ou de lanthane avant déshydratation ou après les coupes, n'ont permis de déceler aucune affinité particulière de ces deux types de zones « claires » pour l'un ou l'autre de ces sels. Seul le traitement au versène après fixation, remplaçant celui à l'acétate d'uranyle, permet de distinguer une différence de comportement entre ces deux types de zones « claires » : le matériel fibrillaire des plus petites présente une coagulation plus grossière qu'après traitement à l'acétate d'uranyle, tandis que la substance spongieuse des plus volumineuses n'offre aucune altération (fig. 24). Ces résultats permettent donc d'affirmer que les petites zones « claires » très dispersées correspondent au matériel nucléaire.

La nature du contenu des volumineuses « zones claires », sans doute analogue à celui des inclusions du tréponème de *Scrobicularia piperata*, nous échappe. Le fait que ce contenu soit peu opaque aux électrons exclut qu'il puisse s'agir de polymères de métaphosphate (volutine) ; d'ailleurs ces inclusions ne présentent pas, au microscope optique, la coloration métachromatique caractéristique. La nature lipidique (acide β-hydroxybutyrique) ou glucidique (glycogène, amidon) n'est guère à envisager car leur contenu ne se colore ni par le noir

---

Fig. 16. — Coupes de *T. minutum*. L'enveloppe présente fréquemment des décollements et des boursouflures qui dénotent une certaine fragilité. Gr : 60.000.

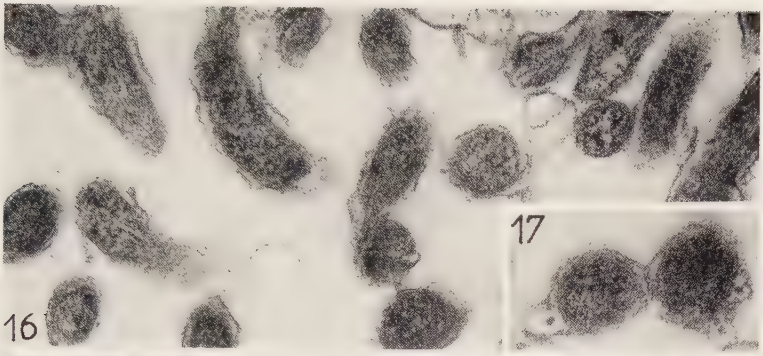
Fig. 17. — Coupes transversales de *T. minutum* montrant les fibrilles situées sous l'enveloppe. Gr : 80.000.

Fig. 18. — Cristispire observée, en mouvement, dans la tige cristalline. Contraste de phase. Mise au point sur une partie du faisceau de fibrilles. Gr : 2.500.

Fig. 19. — Cristispire, immobilisée par pression dans sa tige cristalline, observée en contraste de phase. Mise au point sur le corps cellulaire. On distingue de nombreux et volumineux granules dispersés le long du corps cellulaire. Gr : 5.250.

Fig. 20. — Cristispire colorée par la méthode de Piechaud (1959) (*). Le matériel nucléaire, très abondant, est réparti tout le long de la cellule et semble fragmenté. Gr : 2.550.

(*) Nous remercions Monsieur Piechaud d'avoir effectué cette coloration,


16
17

18

19

20

soudan, ni par le lugol. Enfin l'éventualité de dépôts de soufre élémentaire, comme ceux qui surviennent chez les bactéries sulfureuses se développant dans les milieux riches en sulfure, est difficilement concevable, compte tenu du strict saprophytisme des cristispires étudiées ici.

Ces volumineuses inclusions sont déjà visibles dans le microorganisme à l'état frais, en microscopie à contraste de phase ; elles se présentent sous l'aspect de 20 à 30 corps ovoïdes, plus denses que le cytoplasme environnant, disposés en une file continue le long du corps cellulaire (fig. 19).

Les colorations de Gram, de Giemsa, à l'orangé d'acridine, et la coloration du matériel nucléaire (fig. 20) concordent pour montrer la discontinuité du cytoplasme et du noyau. Nous pensons que les volumineuses inclusions sont à l'origine des aspects de segmentation, la fixation et les colorations provoquant la rétraction du matériel cytoplasmique et nucléaire, de sorte que ce dernier apparaît fragmenté par des inclusions plus volumineuses qu'initialement. Ainsi s'expliquerait l'aspect pluricellulaire décrit chez les cristispires.

A la périphérie du cytoplasme, on distingue un grand nombre de vésicules arrondies, limitées par deux membranes concentriques à triple feuillet, de structure analogue à celle de la membrane cytoplasmique des bactéries (fig. 21, fig. 22). Il est difficile d'affirmer que ces structures sont formées par l'invagination de la membrane comme le sont par exemple les mésosomes et les chromatophores. Ces vésicules contiennent un matériel fibrillaire très lâche et quelques granules ayant l'aspect et la dimension des ribosomes. Ces organites occupent la plus grande partie de la périphérie du cytoplasme, comme le montrent les coupes tangentielles à la surface de la cellule (fig. 23). Seules les régions au niveau desquelles passe le faisceau de fibrilles en sont dépourvues (fig. 26).

L'organe locomoteur est très volumineux. Il est constitué de plusieurs centaines de fibrilles et offre l'aspect d'une véritable chevelure (fig. 21, fig. 23, fig. 25, fig. 26). Le diamètre de la fibrille est toujours de l'ordre de 170 Å. Le faisceau de fibrille s'enroule en hélice autour du corps cellulaire et l'ensemble est recouvert par l'enveloppe. Sur certaines coupes transversales le faisceau de fibrilles est nettement décollé du corps cellulaire ; dans ce cas il demeure recouvert par l'enveloppe, ce qui confirme la très grande souplesse de cette dernière. Au microscope optique, le faisceau de fibrilles correspond à la « membrane ondulante » décrite par Certes (fig. 18).

Sur les coupes transversales et longitudinales passant au niveau du faisceau de fibrilles, la membrane limitant le cytoplasme semble épaissie et présente des ondulations régulières et très serrées (fig. 26). Lorsque la membrane est coupée tangentiellement dans cette région, elle offre un aspect mamelonné très particulier (fig. 25). Rien ne permet de penser que les ondulations de cette membrane correspondent à une zone d'insertion de fibrilles.

Enfin, extérieurement à l'enveloppe, on trouve des bactéries vivant peut-être en symbiose avec la cristispire (fig. 26).

d) *L. ictero-hemorrhagiae* se distingue plus nettement des autres *Spirochaetales.*

Le diamètre de *L. ictero-hemorrhagiae* est très petit : 0,1 μ seulement. L'enveloppe externe apparaît plus dissociée du corps cellulaire que chez les autres *Spirochaetales.* Elle mesure de 100 à 120 Å d'épaisseur et apparaît constituée de trois feuillets sur les coupes colorées au plomb, comme pour les autres *Spirochaetales.* Ces feuillets sont toutefois plus facilement individualisés. Le feuillet central, plus transparent aux électrons, mesure environ 50 Å d'épaisseur, tandis que les deux autres ne mesurent que 25 à 30 Å (fig. 30). La coloration au nitrate de lanthane fait apparaître une nouvelle couche dense sans que l'épaisseur totale de l'enveloppe ait varié ; cette nouvelle structure se situe au sein du feuillet central à proximité du feuillet externe (fig. 27 et 28). Le traitement des autres *Spirochaetales* par le nitrate de lanthane ne révèle pas cette structure.

Le cytoplasme, limité par une membrane de trois feuillets comme chez les autres *Spirochaetales,* apparaît nettement plus dense que chez

---

Fig. 21. — Vue de la cristispire à un faible grossissement. Le corps cellulaire présente une forme hélicoïdale typique. Il contient de petites vésicules marginales (v), de nombreuses petites vacuoles claires de formes variables et correspondant au matériel nucléaire (n). Le faisceau de fibrilles (f) est constitué de plusieurs centaines de fibrilles. On distingue des zones mamelonnées correspondant à la surface du corps cellulaire sur laquelle s'applique le faisceau de fibrilles. Gr : 11.000.

Fig. 22. — Détails de la périphérie du cytoplasme de la cristispire. Le cytoplasme est limité par une membrane (m) constituée de 3 feuillets souvent difficiles à distinguer. On trouve très souvent, près de la zone où passe le faisceau de fibrilles, un feuillet dense supplémentaire sous-jacent (s). De nombreuses vésicules (v) limitées par 2 membranes à triples feuillets sont localisées le long de la membrane limitant le cytoplasme. Il n'est pas possible de distinguer une véritable continuité entre cette membrane et l'une ou l'autre des membranes formant ces vésicules. Les petites vacuoles claires (n), très mal délimitées, remplies d'un matériel fibrillaire, correspondent au noyau. La nature de la substance spongieuse qui constitue les grosses inclusions (V) n'a pas pu être identifiée. Gr : 53.000.

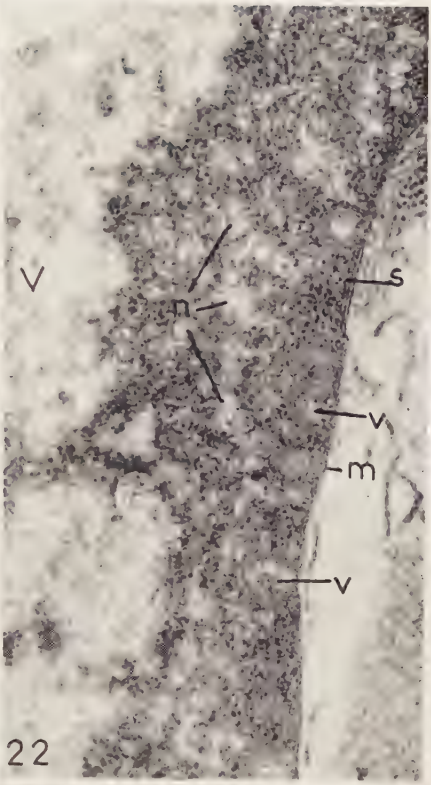
Fig. 23. — Coupe tangentielle à la surface du corps cellulaire de la cristispire, sur laquelle apparaîssent un grand nombre de vésicules (v) constituées de deux membranes. Une portion du faisceau de fibrilles (f) apparaît en coupe longitudinale. Noter les nombreux replis de l'enveloppe (e). Gr : 38.000.

Fig. 24. — Cristispires traitées au versène. Le traitement ne produit aucun changement dans l'aspect de la substance spongieuse contenue à l'intérieur des grosses inclusions (V) mais provoque une coagulation grossière du matériel des petites vacuoles (n). Ces dernières correspondent donc au noyau. Gr : 40.000.

Fig. 25. — Détails de la surface mamelonnée du corps cellulaire de la cristispire sur laquelle s'applique le faisceau de fibrilles. L'enveloppe (e) montre de nombreux replis. Gr : 30.000.

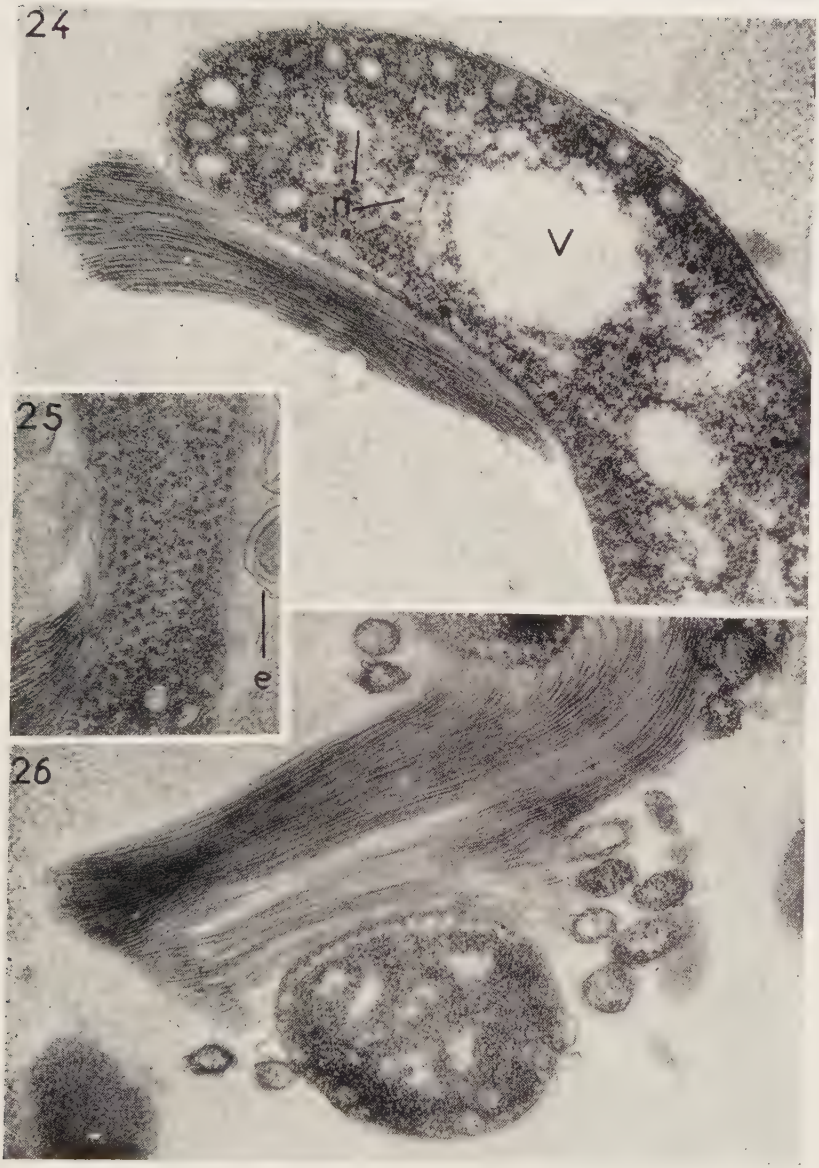
Fig. 26. — Cristispire coupée transversalement ; la surface sur laquelle s'applique le faisceau de fibrilles présente des ondulations régulières. Noter l'absence de vésicules au voisinage du faisceau de fibrilles. Les petits corps plus ou moins arrondis situés extérieurement à l'enveloppe sont très probablement des bactéries. Gr : 34.000.

21



22

23


24
n
V
25
e
26

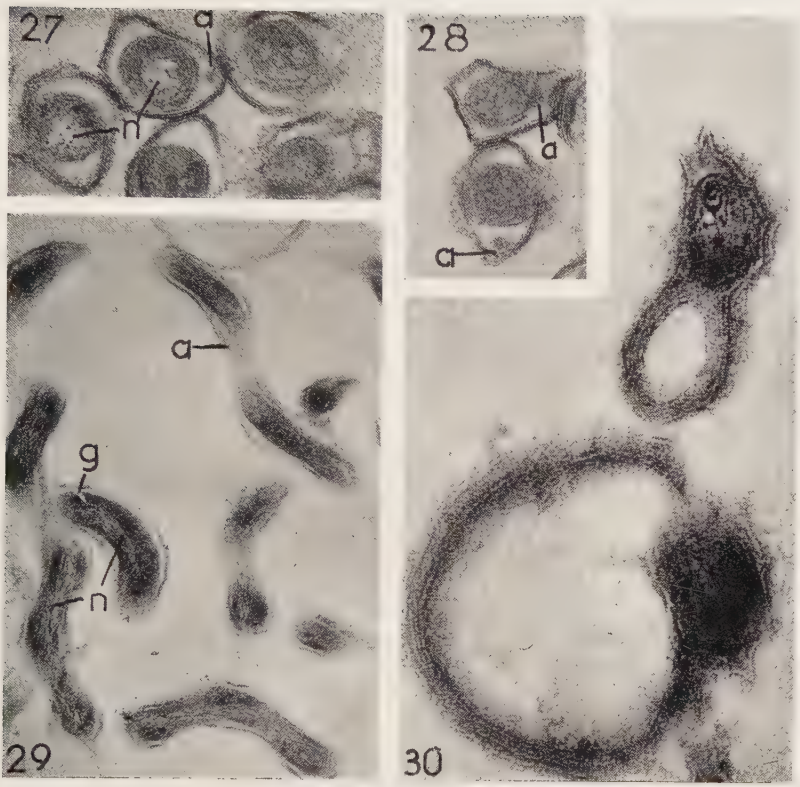


Fig. 27 et 28. — Coupes transversales de *L. ictero-hemorrhagiae* après contraste au nitrate de lanthane. Un feuillet dense, central, supplémentaire, apparaît dans l'enveloppe. Le cytoplasme est limité par une membrane analogue à celle des tréponèmes. Il contient des zones filamenteuses correspondant au noyau (n). L'axostyle (a), situé entre l'enveloppe et la membrane, est nettement séparé de cette dernière ; il semble constitué d'un corps central de 80 Å de diamètre et d'une gaine peu dense aux électrons de 35 à 40 Å. Gr : 155.000.

Fig. 29. — *L. ictero-hemorrhagiae* en coupes longitudinales montrant l'axostyle (a) autour duquel s'enroule le corps cellulaire, le noyau (n) de forme allongée est beaucoup mieux délimité que chez les tréponèmes. Le cytoplasme, très dense, contient quelques granules (g) qui sont probablement des grains de polyphosphate. Gr : 60.000.

Fig. 30. — Coupes de *L. ictero-hemorrhagiae* contrastées à l'acétate de plomb montrant des formations arrondies constituées de plusieurs couches concentriques offrant l'aspect de figures myéliniques ; elles sont en contact direct avec le corps cellulaire et sont recouvertes comme ce dernier par l'enveloppe. Ces structures arrondies correspondent aux formations bulleuses visibles sur les préparations à l'acide phosphotungstique. Avec ce contraste l'enveloppe ne présente que 2 feuillets denses limitant un feuillet interne plus clair. Gr : 156.000.

ces dernières ; on y identifie difficilement les ribosomes. On note dans le cytoplasme quelques granules d'environ 200 à 300 Å de diamètre, analogues aux grains de polyphosphate de certaines bactéries (fig. 29).

Le noyau apparaît beaucoup mieux délimité et offre sur les coupes longitudinales l'aspect d'une zone filamenteuse allongée. Sur les coupes transversales, le noyau généralement arrondi occupe souvent une position légèrement décentrée. Il n'est jamais limité par une membrane, comme chez les autres *Spirochaetales*.

L'axostyle que l'on peut suivre parfois sur les coupes longitudinales, est rarement visible sur les coupes transversales non colorées. Il devient parfaitement décelable après coloration au nitrate de lanthane. Le diamètre de l'axostyle est d'environ 180 Å. Cette dimension est un peu inférieure à celle mesurée en contraste négatif ; cette diminution est probablement due à la déshydratation et à l'inclusion. L'axostyle semble constitué d'une partie centrale dense de 80 Å de diamètre et d'une gaine périphérique moins dense aux électrons, de 35 à 40 Å d'épaisseur environ.

On observe parfois des structures arrondies constituées de plusieurs couches concentriques analogues à des structures myéliniques (Bangham et Horne, 1964). Ces structures semblent se constituer à partir de la membrane limitant le cytoplasme ou à partir de l'interstice compris entre l'enveloppe et le corps cellulaire (fig. 30).

Des travaux conduits parallèlement aux nôtres, par Listgarten, Loesche et Socransky (1963) sur *T. microdentium*, par Bladen et Hamp (1964) sur ce même tréponème et le spirochète de Vincent, par Kawata et Inoue (1964) sur *T. reiteri*, par Simpson et White (1964) sur *L. pomona*, confirment dans leur ensemble nos résultats.

Conclusions.

1°. Les *Spirochaetales* présentent l'architecture cellulaire des procaryotes.

— Le chromosome semble inclus dans une vacuole centrale s'étendant tout le long de la cellule ; aucune membrane ne sépare les fibrilles d'A.D.N. du reste du cytoplasme, comme chez les bactéries.

— Le cytoplasme est limité par une membrane analogue à la membrane cytoplasmique des bactéries. Elle forme des mésosomes à l'intérieur du cytoplasme. Il n'y a pas de plastide.

— L'élément fonctionnel de l'appareil locomoteur (fibrille ou axostyle) examiné en coupes transversales, ne se résout pas en sous-unités comme c'est le cas chez les protozoaires.

2°. L'originalité des *Spirochaetales* réside dans la *situation* de *l'appareil locomoteur* qui est interne, intercalé entre l'enveloppe externe et la membrane limitant le cytoplasme.

3°. Les *Spirochaetales* sont *unicellulaires* ; les aspects de segmentation décrits après coloration correspondent à des artéfacts.

4°. Une *définition anatomique du genre* paraît possible. Trois groupes peuvent être distingués : le premier comprend les tréponèmes et les borrelia, le second les cristispires, le dernier les leptospires.

La disposition et le nombre des éléments de l'appareil locomoteur constituent le critère fondamental pour cette distinction.

5°. Les différences morphologiques entre les espèces du genre *Treponema* sont trop faibles pour qu'une *définition anatomique de l'espèce* puisse être proposée.

CHAPITRE III.

CONSTITUTION ANTIGÉNIQUE DES *SPIROCHAETALES.*

L'anatomie ne permettant ni une distinction nette entre les genres *Treponema* et *Borrelia,* ni une séparation des espèces au sein du genre *Treponema,* nous avons cherché à préciser la classification des *Spirochaetales* en recherchant les communautés antigéniques entre les constituants de ces cellules. Pour cette étude, les différentes techniques immunologiques que nous avons utilisées ne se sont pas montrées d'égale valeur ; nous sommes donc amenés à envisager, en même temps, la valeur relative des différentes techniques immunologiques pour mettre en évidence les communautés antigéniques entre les constituants cellulaires des *Spirochaetales.*

I. — Etude des communautés antigéniques entre les espèces des genres Treponema, Borrelia et Leptospira.

Dans la première partie de ce travail, nous avons recherché les communautés antigéniques entre *T. reiteri, T. minutum, B. hispanica* et *L. ictero-hemorrhagiae,* en comparant les données de l'agglutination, de la fixation du complément, de l'immunofluorescence et de l'immunoprécipitation en gel. Cette étude inclut également *T. pallidum,* mais devant l'impossibilité d'en obtenir une récolte suffisante, l'immunoprécipitation en gel n'a pu être réalisée pour cette *Spirochaetale.*

Le degré de communauté antigénique entre cellules soulève un problème d'interprétation que nous examinerons en premier. La dilution limite d'activité d'un immunsérum, réagissant avec le complexe d'antigènes ayant servi à l'immunisation, est fonction du poids total d'anticorps présent dans le sérum, quelles que soient les différentes spécificités impliquées dans la réaction. Si nous comparons la limite d'activité d'un immunsérum vis-à-vis de la préparation cellulaire homologue et d'une préparation cellulaire hétérologue, la limite d'activité du sérum dans la réaction hétérologue, est en principe inférieure à celle du sérum dans la réaction homologue ; l'écart entre les deux dilutions doit être inversement proportionnel au nombre de sites antigéniques communs entre les deux préparations.

C'est pourquoi, pour les trois premières réactions précitées (agglutination, fixation du complément, immunofluorescence), nous avons recherché les communautés antigéniques entre *Spirochaetales,* en comparant les dilutions limites d'activité d'un même immunsérum vis-à-vis des différentes préparations de *Spirochaetales* à analyser. La limite d'activité de l'immunsérum vis-à-vis du spirochète homo-

logue constitue la référence ; on chiffre dans ce cas la communauté à son maximum, soit ++++. Si ce même immunsérum, vis-à-vis d'autres *Spirochaetales*, présente une limite de réaction à une dilution 3, 9, 27 fois plus faible, la communauté antigénique est chiffrée respectivement, à +++, ++, +.

Pour la fixation du complément, les réactions hétérologues sont faibles ou négatives par défaut d'antigène à la concentration antigénique optimale pour la réaction homologue. En effet, l'optimum antigénique dans une réaction homologue est celui d'un système immunologique complexe ; l'optimum antigénique dans une réaction hétérologue est celui d'un système immunologique plus simple ; l'optimum peut donc se situer dans ce dernier cas, à une concentration antigénique supérieure à la concentration optimale du système homologue (Pillot, Dupouey et Faure, 1960). Aussi utilisons-nous conjointement dans cette réaction deux concentrations d'antigène ; celle optimale pour la réaction homologue et une autre 5 fois plus forte. Les résultats alors comparés sont ceux obtenus à une concentration 5 fois plus forte, pour les réactions hétérologues.

Cette façon d'apprécier les communautés antigéniques n'est que grossièrement quantitative ; en effet, la réaction propre d'un antigène commun peut être modifiée d'une cellule à l'autre par des facteurs non spécifiques inhérents à chaque cellule.

Pour l'immunoprécipitation en gel, en opposant dans une même cuve les différentes préparations cellulaires vis-à-vis d'un même immunsérum non dilué, on révèle d'emblée les antigènes communs ou propres à chaque préparation.

Appréciés avec chacune des quatre techniques immunologiques, les degrés de communautés antigéniques entre trois souches du genre *Treponema* appartenant à trois espèces distinctes, une souche de *B. hispanica* et une souche de *L. ictero-hemorrhagiae*, sont mentionnés dans le tableau II.

Dans tous les cas, les risques de confusion inhérents à la présence d'anticorps naturels, c'est-à-dire survenant en dehors d'une immunisation connue, ont été contrôlés ; les résultats ne mentionnent que des communautés mises en évidence par les seuls immun-anticorps.

T. reiteri, *T. minutum*, *T. pallidum* et *B. hispanica* présentent des communautés antigéniques ; par contre, *L. ictero-hemorrhagiae* se révèle immunologiquement bien distincte des quatre autres *Spirochaetales*. Dans certains cas la réaction hétérologue est unilatérale ; ainsi, le sérum anti-*T. pallidum* donne une réaction croisée avec *B. hispanica* tandis que le sérum anti-*B. hispanica* ne donne pas de réaction croisée avec *T. pallidum* ; de même, le sérum anti-*T. minutum* réagit avec *B. hispanica* mais le sérum anti-*B. hispanica* est sans action sur *T. minutum*. Les résultats sont les mêmes quelle que soit l'espèce qui a élaboré l'anticorps (lapin ou homme), que l'immunisation ait été artificiellement provoquée par injection de *Spirochaetales* tuées, ou consécutive à l'infection dans le cas des *Spirochaetales* pathogènes.

En comparant les résultats obtenus avec chacune des techniques immunologiques, nous constatons que l'agglutination est très spécifi-

TABLEAU II.

Degré de communauté antigénique entre différentes Spirochaetales.

Souches		*T. reiteri*				*T. minutum*				*T. pallidum*		
Réactions immunologiques		A (*)	FC	IF	P	A	FC	IF	P	A	FC	IF
Sérums de lapins	anti-*T. reiteri*	1/810 ++++	1/270 ++++	1/810 ++++	7	—	++	++	1	—	++	++++
	anti-*T. minutum*	—	++	+++	1	1/810 ++++	1/270 ++++	1/270 ++++	5	—	+	+++
	anti-*T. pallidum*	—	+++	+++	1	—	+	+	1	1/90 ++++	1/90 ++++	1/270 ++++
	anti-*B. hispanica*	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—
	anti-*L. ictero-hemorrhagiae*	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sérums humains	anti-*T. pallidum*	—	+++	+++	1	—	+++	+++	1	1/90 ++++	1/30 ++++	1/810 ++++
	anti-*B. hispanica*	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	anti-*ictero-hemorrhagiae*	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Souches		*B. hispanica*				*L. ictero-hemorrhagiae*			
Réactions immunologiques		A	FC	IF	P	A	FC	IF	P
Sérums de lapins	anti-*T. reiteri*	—	++	++++	—	—	—	—	—
	anti-*T. minutum*	—	—	+++	—	—	—	—	—
	anti-*T. pallidum*	—	—	+++	—	—	—	—	—
	anti-*B. hispanica*	1/90 ++++	1/270 ++++	1/810 +++	6	—	—	—	—
	anti-L. *ictero-hemorrhagiae*	—	—	—	—	1/90 ++++	1/90 ++++	1/270 ++++	3
Sérums humains	anti-*T. pallidum*	—	—	+++	—	—	—	—	—
	anti-*B. hispanica*	1/270 ++++	1/4 ++++	NE	NE	—	—	NE	NE
	anti-*L. ictero-hemorrhagiae*	—	—	—	—	1/270 ++++	1/270 ++++	1/810 ++++	3

A : agglutination. FC : fixation du complément. IF : immunofluorescence. P : immunoprécipitation. Les dilutions indiquent la limite d'activité du sérum dans la réaction homologue. Les chiffres de la colonne P donnent le nombre de raies de précipitation dans le gel. NE : réactions non effectuées par manque de sérum.

(*) Tous les sérums d'homme ou de lapin normaux agglutinent *T. reiteri* (anticorps naturel) mais l'immunisation avec une autre *Spirochaetale* n'augmente pas le pouvoir agglutinant de ces sérums vis-à-vis de *T. reiteri*.

que, la plus spécifique de toutes les réactions puisque les cinq *Spirochaetales* ne sont agglutinées que par l'immunsérum homologue. La spécificité de l'immunoprécipitation est nette entre les genres ; dans le genre *Treponema* la plupart des antigènes qu'elle révèle sont spécifiques de l'espèce. Les réactions croisées semblent plus fréquentes avec la fixation du complément ; cette réaction est toujours plus intense avec le système homologue, mais la distinction entre les espèces ne repose que sur des différences quantitatives parfois peu marquées.

C'est l'immunofluorescence qui révèle le plus grand nombre de communautés antigéniques ; elle est toujours positive si l'une des trois autres réactions est positive ; entre *T. minutum* et *B. hispanica,* elle est la seule réaction capable de révéler une communauté. Avec l'immunofluorescence, l'appréciation du degré de communauté antigénique en fonction de la limite d'activité de l'immunsérum devient plus aléatoire ; en effet, le sérum anti-*T. reiteri* réagit à la même dilution limite sur *T. reiteri, T. pallidum* et *B. hispanica.* Ce fait peut s'expliquer, soit par la relation asymptotique qui existe entre l'énergie lumineuse émise et les fortes concentrations en fluorochrome, soit par un mécanisme compétitif entre les molécules d'antiglobulines marquées au fur et à mesure que le nombre des sites antigéniques augmente dans la cellule. Dans ces conditions, l'immunofluorescence n'a donc que peu ou pas d'intérêt pour la distinction des espèces.

Au contraire, à cause de sa très grande sensibilité, l'immunofluorescence s'avère une réaction particulièrement intéressante pour préciser l'absence de communauté entre les *Spirochaetales.*

II. — Etude des communautés antigéniques entre une espèce du genre *Cristispira* et des espèces appartenant à d'autres genres de *Spirochaetales.*

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons poursuivi l'étude des communautés antigéniques entre les espèces de différents genres de *Spirochaetales,* en étudiant vis-à-vis des immunsérums utilisés précédemment, les préparations de *Spirochaetales* étudiées anatomiquement pour lesquelles nous ne possédions pas les immunsérums correspondants. En raison de la grande sensibilité de l'immunofluorescence, nous n'avons utilisé que cette réaction ; elle est d'ailleurs la seule praticable avec les faibles quantités de *Spirochaetales* dont nous disposons dans les tiges cristallines.

Les résultats obtenus en se référant pour chaque immunsérum à sa limite d'activité vis-à-vis de la *Spirochaetale* homologue, sont mentionnés dans le tableau III. Les trois nouvelles espèces du genre *Treponema* sont immunologiquement apparentées aux trois espèces de tréponèmes et à la borrelia de la première partie du travail. Aucune communauté antigénique n'est décelable entre la souche du genre *Cristispira* et les souches des autres genres de *Spirochaetales.*

TABLEAU III.

Communauté antigénique chez les Spirochaetales *en immunofluorescence.*

Sérums de lapins :	Souches de :			
	T. phagedenis	*T. vincentii*	Tréponème de *Scrobicularia piperata*	Cristispire de *Tapes*
anti-*T. reiteri*	++++	++	++	—
anti-*T. minutum*	++++	+	+	—
anti-*T. pallidum*	+++	+	+	—
anti-*B. hispanica*	++	++	+	—
anti-*L. ictero-hemorrhagiae*	—	—	—	—

La communauté est appréciée par référence à la plus forte dilution de l'immunsérum active avec la *Spirochaetale* homologue. (cf. tableau II).

Conclusions.

1°. Des quatre techniques immunologiques utilisées, l'immunofluorescence révèle les communautés antigéniques avec la plus grande sensibilité ; elle est positive là où les autres techniques sont défaillantes.

2°. La distinction faite sur la foi des critères anatomiques entre les genres *Treponema, Leptospira* et *Cristispira,* trouve une justification dans l'étude de la structure antigénique : il n'y a aucune communauté antigénique décelable entre les représentants de ces trois genres. Par contre, la séparation des genres *Treponema* et *Borrelia* n'est pas justifiée immunologiquement bien que leur communauté ne soit révélée pratiquement que par la réaction la plus sensible.

3°. Les communautés antigéniques sont constantes entre les espèces du genre *Treponema,* quel que soit l'hôte (mammifère ou mollusque) qui les héberge. Toutefois, l'agglutination donne une réaction spécifique de l'espèce et la plupart des antigènes révélés en gel sont également spécifiques des espèces étudiées. L'immunologie permet donc l'individualisation d'espèces chez les tréponèmes.

CHAPITRE IV.

LA SIGNIFICATION DES FORMES ATYPIQUES ET LA NOTION DE CYCLE ÉVOLUTIF CHEZ LES *SPIROCHAETALES*.

L'accord a été et reste unanime pour reconnaître à la forme hélicoïdale des *Spirochaetales*, la faculté de se reproduire par division transversale (les partisans d'un cycle évolutif n'y voient que l'un des modes de reproduction des *Spirochaetales*) et une prépondérance sur les formes « atypiques » dans la phase de multiplication active. C'est pourquoi, tous les aspects morphologiques des *Spirochaetales* dont l'observation fut à l'origine de la théorie cyclique ne sauraient être définis que par référence à la forme hélicoïdale (fig. 31 A). Nous définirons comme formes « atypiques » tout ce qui n'a pas la forme d'un fin cylindre régulier, enroulé en hélice, la régularité de l'hélice n'étant pas obligatoirement parfaite.

Les formes « atypiques » des *Spirochaetales* décrites dans la littérature peuvent être schématisées sous trois aspects :

a) *Les formes « rondes »* (fig. 31 B). La forme hélicoïdale porte une boucle ou une vésicule, le plus souvent à une extrémité ; s'il n'y a plus de filament hélicoïdal attenant, il s'agit d'anneau ou de sphéroïde. Dans les formes hélicoïdales vésiculées ou les sphéroïdes, les auteurs discernent des granules, des noyaux ou même des *Spirochaetales*. Delamater (1951 a, b) distingue deux types de sphéroïdes, les uns plus petits qu'il appelle « unispirochétiens », les autres plus volumineux, « multispirochétiens », selon le nombre de *Spirochaetales* qu'il y décèle. Ces formes « rondes » ont été observées surtout chez les tréponèmes de culture ; elles sont visibles à tous les stades de la croissance mais leur nombre est minimum à la phase active de multiplication. Delamater voit dans les sphéroïdes « unispirochétiens » les stades d'une reproduction végétative et dans les sphéroïdes « multispirochétiens » une reproduction soit sexuée soit parthénogénétique. Bentz (1957) distingue les sphéroïdes de début de croissance de ceux de fin de croissance et leur attribue des fonctions différentes. Certains auteurs (Woratz, 1954) voient dans ces formes « rondes » des phénomènes de « quiescence » et d'autres (Ovchinnikov, 1955) les comparent aux spores des bactéries.

b) *Les formes granuleuses* (fig. 31 C). Il s'agit de granules fixés sur la forme hélicoïdale et dont le diamètre n'est que légèrement supérieur au diamètre de cette dernière. Beaucoup d'auteurs retrouvent ces granules, libres dans le milieu ambiant (Coutts, 1953 ; Czekalowski et Eaves, 1954) ; ils les considèrent comme capables de traverser les

filtres stérilisants et leur attribuent la possibilité de redonner la forme hélicoïdale : c'est le granule spirochétogène des anciens auteurs. Mollinedo (1941) le décrit sous des aspects qui vont du simple granule sphérique à une forme allongée dessinant une fraction de tour de spire, portant un très fin filament hélicoïdal visible après imprégnation argentique ; il le retrouve en fin de culture et estime qu'il résulte d'une fragmentation multiple et inégale de la forme hélicoïdale (spirochétogène de Seguin et Mollinedo). D'autres auteurs (Hampp, 1948, 1951 ; Bentz, 1957 ; Gelt'cer et Krylova, 1957 ; Ovchinnikov, 1961)

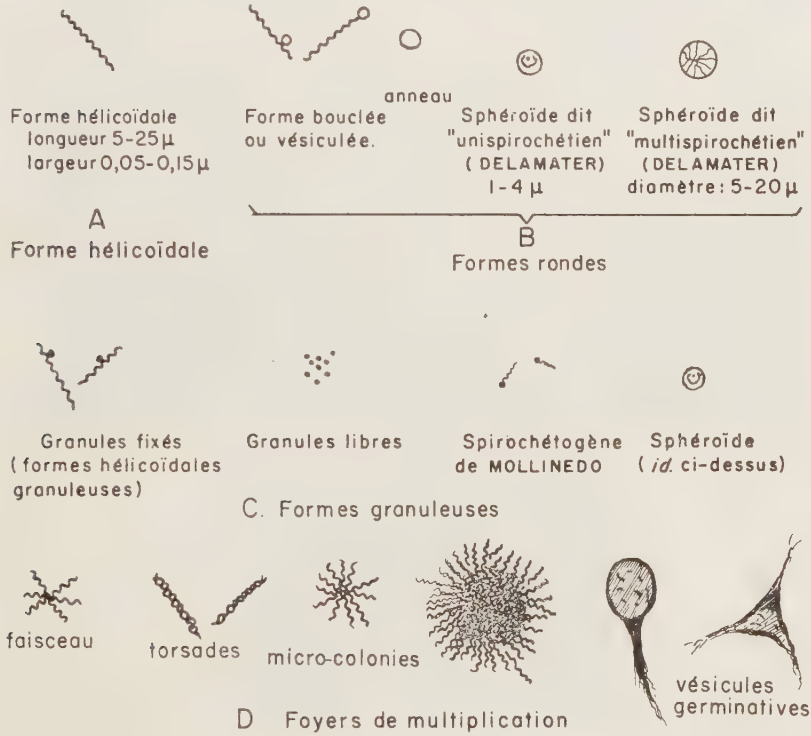


Fig. 31. — Schématisation des différents aspects décrits au microscope optique chez les *Spirochaetales*.

dénomment granules des formations nettement plus volumineuses que celles qu'ont observées les auteurs précédents et qui ne sont que les sphéroïdes de petites dimensions précédemment mentionnés.

c) *Les foyers de multiplication* (fig. 31 D). Nous regroupons sous cette dénomination : les associations en faisceau ou en torsades de quelques formes hélicoïdales qui ont été décrites comme l'équivalent

de phénomènes de sexualité (Delamater, 1951 b ; Gangel et Themann, 1956), les microcolonies à centre d'aspect granulaire, les vésicules dites « germinatives » décrites par Bentz (1957) qui se présentent le plus souvent comme des corps piriformes de 5 à 15 μ munis ou non de prolongements plus ou moins ramifiés. Ces aspects sont surtout observés durant la phase de latence et durant la première moitié de la phase logarithmique de croissance.

Dans le présent travail, nous précisons la signification biologique des divers aspects morphologiques que nous avons rencontrés chez les *Spirochaetales*. Nous avons surtout recours à *T. reiteri*, ayant eu l'occasion de préciser les conditions optimales de sa culture. Nous déterminons les conditions de culture dans lesquelles les formes « atypiques » apparaissent et la façon dont on peut provoquer artificiellement leur formation. Nous donnons des précisions sur la structure morphologique, chimique et immunologique de ces formes, comparativement à celle de la forme hélicoïdale, et nous démontrons le rôle particulier de l'enveloppe dans la formation et l'aspect de certaines de ces formes « atypiques ». Parallèlement, nous retrouvons chez toutes les *Spirochaetales* étudiés (autres tréponèmes, borrelia, leptospires) les mêmes causes de polymorphisme. Après une étude critique de certains aspects décrits dans le passé et que nous n'avons pas observés, nous concluons finalement à l'absence de cycle chez les *Spirochaetales*.

I. — Les formes « rondes ».

A) Les conditions de leur apparition dans les cultures. Etude à l'état frais.

Parmi tous les aspects morphologiques atypiques, les formes « rondes » ont été les plus étudiées parce que les plus facilement observées, surtout chez les tréponèmes.

Avec *T. reiteri*, nous trouvons les formes « rondes » à tous les stades de la croissance, seulement dans les milieux peu favorables. De plus, les formes hélicoïdales sont d'autant plus longues et les formes « rondes » plus volumineuses, que le milieu convient moins à la croissance. Dans de bonnes conditions de culture (repiquage fréquent, culture continue), les formes « rondes » sont exceptionnelles durant les phases de latence et de croissance exponentielle ; elles apparaissent seulement bien au-delà de la phase exponentielle, vers le neuvième-dixième jour.

La survenue des formes « rondes » est le plus souvent précédée par l'apparition de granulations sur le trajet du filament hélicoïdal (fig. 31 C, granules fixés ; fig. 32 A) ; l'apparition des granulations va de pair avec une diminution de la mobilité des tréponèmes, et survient vers le septième jour, deux jours après la fin de la croissance exponentielle. En microscopie interférentielle les granulations se présentent en relief sur le reste du tréponème. Si l'on poursuit l'incubation, les granulations disparaissent alors qu'apparaissent les formes « rondes ». Les formes « rondes » sont, au départ, des formes hélicoïdales portant

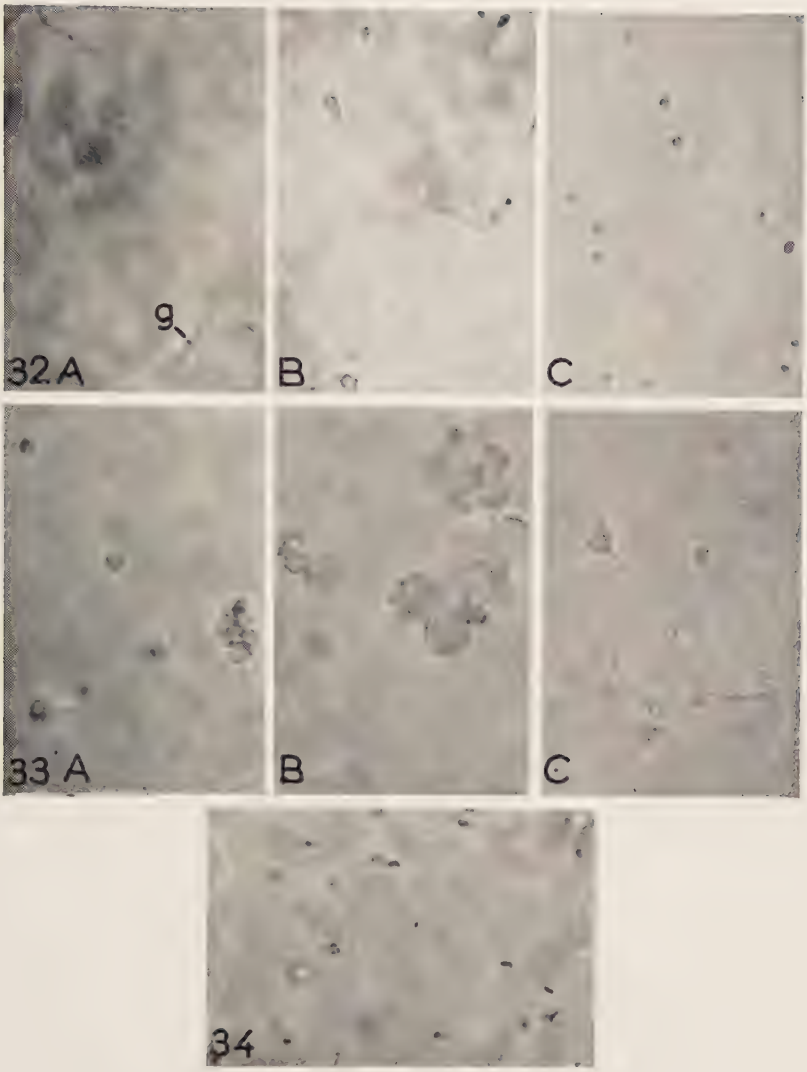


Fig. 32. — *Les différents stades de* T. reiteri *en culture.*
Contraste de phase. Gr. 1030.

A. — Formes hélicoïdales granuleuses ; 7 jours de culture. g : mise au point sur le granule.
B. — Formes hélicoïdales vésiculées ; 14 jours de culture.
C. — Sphéroïdes ; 2 mois de culture.

Fig. 33. — *Sphéroïdes de* T. reiteri *obtenus artificiellement à pH 10.*
Contraste de phase. Gr. 1030.

A. — A partir de formes hélicoïdales de dimensions normales : 5-10 μ de longueur.
B. — A partir de formes hélicoïdales longues de 10-25 μ. Les sphéroïdes sont plus volumineux que précédemment.
C. — Après traitement par l'eau saturée de butanol. Un filament grossièrement hélicoïdal a été libéré.

Fig. 34. — *Rétraction des sphéroïdes en milieu macromoléculaire.*
Contraste de phase. Gr. 1030.
Sphéroïdes de la figure 33 B repris dans le dextrane à 15 p. 100.

une vésicule (fig. 32 B), puis des sphéroïdes sans filament hélicoïdal (fig. 32 C) ; après deux mois d'incubation, toutes les formes hélicoïdales et les formes hélicoïdales vésiculées ont pratiquement disparu ; on ne retrouve plus que les sphéroïdes contenant ou non des granules dont les plus petits sont animés de mouvements browniens.

Bien qu'elles soient décrites dans la littérature, nous n'avons jamais retrouvé de formes bouclées ou annulaires. Par la micromanipulation on voit que toutes les formes « rondes » sont pleines ; ceci est contraire à certaines descriptions dont nous contestons le bien-fondé. Aussi adoptons-nous pour toutes les formes « rondes » le terme de forme « hélicoïdale vésiculée » ou de « sphéroïde ». Avec *B. hispanica* il nous est arrivé d'observer des formes douées d'une très vive motilité qui, à la faveur d'inflexions très prononcées, forment un anneau en joignant leurs deux extrémités. Par contre, grâce à la micromanipulation, on constate que toutes les formes « rondes » ne sont pas strictement des formes hélicoïdales vésiculées ou des sphéroïdes, mais qu'il existe également des formes discoïdes, avec ou sans filament hélicoïdal attenant. Au cours de la micromanipulation des formes hélicoïdales vésiculées, filament hélicoïdal et vésicule sont étroitement solidaires. Quant aux sphéroïdes, ils apparaissent limités par une enveloppe bien définie, difficile à transpercer du fait de sa souplesse et de son élasticité ; lorsqu'on parvient à transpercer un sphéroïde, l'enveloppe s'affaisse et l'on retrouve un élément hélicoïdal ou quelques granules.

L'aptitude à donner les formes hélicoïdales vésiculées et les sphéroïdes en culture varie au sein des espèces de *Spirochaetales*. De toutes les espèces cultivables de tréponèmes, *T. phagedenis* les donne le plus rapidement, puis par ordre décroissant *T. reiteri, T. minutum* et *T. vincentii*. Formes hélicoïdales vésiculées et sphéroïdes sont observés chez les borrelia et les leptospires ; toutefois, chez les leptospires, la vésiculation en culture est rapidement suivie de lyse avec libération de granules dans le milieu et, de ce fait, les formes « rondes » y sont moins fréquemment observées.

B) La formation artificielle des sphéroïdes à partir des formes hélicoïdales.

On peut provoquer facilement cette transformation en milieu alcalin (fig. 33 A).

Il est possible soit d'alcaliniser la culture à pH 10, soit mieux, de reprendre le culot de centrifugation par un tampon borate de sodium 0,1 M de pH 10, sous un volume égal au 1/10 du volume de la culture initiale. Ces conditions permettent de suivre la formation progressive des sphéroïdes, qui est d'autant plus rapide que la température se rapproche de 37°. A cette température le phénomène peut être facilement suivi sous le microscope ; les différents stades du passage de la forme hélicoïdale aux formes atypiques, dans l'ordre suivant, forme hélicoïdale granuleuse, forme hélicoïdale vésiculée, sphéroïde, sont réalisés entre cinq et soixante minutes, selon l'âge de la culture. Cet ordre de transformation n'est pas toujours respecté et l'on assiste souvent au passage direct de la forme hélicoïdale à la forme héli-

coïdale vésiculée ou même au sphéroïde ; dans ce cas, la transition se manifeste par une plicature brutale du filament hélicoïdal. En tampon carbonate pH 9 la formation des sphéroïdes est plus lente. Elle est possible, mais demande plusieurs heures dans l'eau distillée, plusieurs jours dans l'eau physiologique, et même à 37°, toutes les formes hélicoïdales n'évoluent pas jusqu'au stade terminal de sphéroïde certaines persistant à l'état de forme hélicoïdale vésiculée.

On obtient également une transformation instantanée des formes hélicoïdales en sphéroïdes, en soumettant les formes hélicoïdales au choc osmotique (action de NaCl 3 M, puis de l'eau distillée).

A l'état frais et en microscopie optique, formes hélicoïdales vésiculées, discoïdes ou sphéroïdes, artificiellement provoquées ou obtenues dans les conditions naturelles, ont un aspect analogue. Nous désignerons désormais par le terme « vésiculation » l'ensemble de cette transformation.

Les formes hélicoïdales d'une culture ne sont que rarement affectées en totalité par la vésiculation artificielle ; le nombre de formes hélicoïdales qui échappent à la vésiculation peut atteindre dans certains cas 25 p. 100. La vésiculation artificielle affecte un nombre d'autant plus grand de tréponèmes et ceci d'autant plus rapidement, que les tréponèmes se trouvent dans une phase de culture plus éloignée de la phase de multiplication active ; le résultat est le même quand la croissance a cessé par épuisement du milieu ou quand elle a été bloquée à un stade plus précoce par refroidissement à + 6°.

En cultivant *T. reiteri* en présence de glycine 0,6 M, nous obtenons des formes hélicoïdales anormalement longues. En milieu alcalin ces formes donnent des sphéroïdes volumineux de l'ordre de 5 à 20 μ de diamètre qui contiennent plusieurs corps tréponémique enchevêtrés (fig. 33 B), comme les vésicules « multispirochétiennes » de Delamater ; en effet, la perforation de ces sphéroïdes par le micromanipulateur libère plusieurs éléments hélicoïdaux.

Les agents lytiques (lauryl-sulfate à 0,5-1 p. 1.000, teepol à 1-2 p. 1.000...) ou l'eau saturée de butanol, provoquent instantanément l'affaissement des sphéroïdes et redonnent un filament hélicoïdal qui paraît plus fin que la forme hélicoïdale initiale (fig. 33 C). Les filaments hélicoïdaux ainsi recouvrés ne sont plus modifiés, ni par l'alcalinité, ni par le choc osmotique.

Soumises aux mêmes conditions de vésiculation artificielle que *T. reiteri*, les autres *Spirochaetales* donnent des formes hélicoïdales vésiculées ou des sphéroïdes. Avec *T. minutum* et *T. pallidum*, la vésiculation n'est jamais complète, en ce sens que bon nombre d'éléments restent au stade de forme hélicoïdale vésiculée sans évoluer vers le sphéroïde. Formes hélicoïdales vésiculées ou sphéroïdes sont petits dans le cas de *T. pallidum*, volumineux dans le cas de *T. minutum*, proportionnellement à la longueur de la forme hélicoïdale de départ. Avec *B. hispanica* et surtout avec *L. ictero-hémorrhagiae*, la vésiculation est plus difficilement observée car les sphéroïdes se lysent rapidement, libérant d'emblée un élément hélicoïdal aminci dans le cas des borrelia, une multitude de granules dans le cas des leptospires.

Ces faits sont en accord avec les aptitudes des différentes *Spirochaetales* à former des vésicules dans les cultures ; ils impliquent d'une part une plus grande résistance de l'enveloppe chez *T. pallidum* et *T. minutum*, d'autre part une plus faible résistance de la membrane limitant le cytoplasme chez *L. ictero-hemorrhagiae*.

C) Etude en microscopie électronique.

Les coupes de formes hélicoïdales granuleuses et de sphéroïdes de *T. reiteri* récoltés après deux mois d'incubation ou obtenus artificiellement, sont présentées dans les figures 35, 36 et 37. On voit qu'au départ de la vésiculation, la granulation de la forme hélicoïdale correspond à une boursouflure de l'enveloppe, localement décollée du corps cellulaire. La formation du sphéroïde, qu'elle soit spontanée ou provoquée, correspond au décollement subtotal ou total de l'enveloppe. Le corps cellulaire reste à l'intérieur de l'enveloppe et correspond à la *Spirochaetale* ou aux granules que les auteurs décelaient dans les sphéroïdes par la microscopie en contraste de phase ou le fond noir. Dans tous les cas, on note la présence d'éléments fibrillaires et de débris mal définis, probablement cytoplasmiques, à l'intérieur des sphéroïdes, en dehors du corps cellulaire. Dans les sphéroïdes naturels on observe parfois des aspects que l'on peut supposer résulter d'un dédoublement de l'enveloppe (fig. 36). Les différentes structures sont particulièrement altérées dans les sphéroïdes naturels observés après deux mois d'incubation. Chez eux, comparativement aux sphéroïdes artificiels, enveloppe et membrane limitant le cytoplasme sont mal définies ; la zone nucléaire paraît souvent vide et le corps cellulaire est parfois boursouflé ou même totalement autolysé.

Les coupes des filaments hélicoïdaux libérés des sphéroïdes par action de l'eau saturée de butanol sont présentées dans la figure 38. La dispersion de l'enveloppe est totale et ses constituants sont recueillis dans le surnageant de centrifugation ; le corps cellulaire ainsi libéré conserve grossièrement sa morphologie hélicoïdale. Nous pensons que les éléments allongés rencontrés dans la préparation lysée par l'eau saturée de butanol sont les fibrilles.

D) L'inhibition de la vésiculation.

La vésiculation dans les cultures, comme la vésiculation artificielle, peut être prévenue partiellement ou totalement par les macromolécules.

Les albumines (de bœuf, de lapin), les polymères (dextrane, levane, polyvinyl-pyrrolidone) de poids moléculaire de 40.000 environ, empêchent complètement la vésiculation en milieu alcalin, aux concentrations égales ou supérieures à 10 p. 100 ; dans ces conditions, à pH 10, la morphologie hélicoïdale persiste sans modification. A des concentrations inférieures à 10 p. 100, la prévention n'est que partielle : la vésiculation reste au stade intermédiaire de forme hélicoïdale vésiculée.

En culture, l'albumine, le dextrane, le levane agissent à des concentrations du même ordre (la polyvinyl-pyrrolidone qui précipite avec le milieu n'est pas utilisable). La croissance de *T. reiteri* est possible

jusqu'à la limite de solubilité de ces macromolécules, soit 15 p. 100 environ. Toutefois la vitesse de croissance et le rendement final diminuent proportionnellement à la concentration.

Le saccharose et le glucose à saturation ne préviennent que très partiellement la vésiculation en milieu alcalin. Dans une solution saturée de chlorure de sodium cette vésiculation est totalement inhibée, mais pour les concentrations de 3 M à 0,5 M l'inhibition n'est que partielle. Les concentrations de sucres et de NaCl compatibles avec la croissance de *T. reiteri* sont sans effet sur la vésiculation.

Si l'on place des sphéroïdes obtenus naturellement ou artificiellement, dans une solution macromoléculaire de 10 à 15 p. 100, on obtient leur rétraction immédiate ; ils se présentent alors sous l'aspect de croissants ou de calottes de sphéroïdes de petites dimensions (fig. 34). Dans les mêmes conditions, les sucres ou le NaCl, quelle que soit leur concentration, sont sans effet apparent.

Tous ces faits, ainsi que l'affaissement immédiat du sphéroïde après perforation au micro-manipulateur, montrent que les phénomènes osmotiques constituent l'élément moteur de la vésiculation et que l'accumulation d'eau se localise dans l'interstice enveloppe-corps cellulaire. L'enveloppe n'est perméable qu'à l'eau et aux petites molécules. La prévention de la vésiculation artificielle par le chlorure de sodium à saturation peut s'expliquer par une diminution relative du déséquilibre osmotique de part et d'autre de l'enveloppe.

E) Etude chimique.

Cette étude a porté sur la comparaison des sphéroïdes de *T. reiteri* récoltés après deux mois d'incubation à 37°, avec les formes hélicoïdales récoltées vers la fin de la croissance exponentielle.

A mesure que la culture évolue au-delà de la phase stationnaire, le poids sec des germes récoltés diminue peu à peu ; après deux mois d'incubation à 37°, le poids sec des sphéroïdes récoltés se situe entre la moitié et les trois quarts du poids sec des tréponèmes récoltés à la phase stationnaire.

Les résultats des dosages effectués sur les deux types morphologiques extrêmes du tréponème sont mentionnés dans le tableau IV.

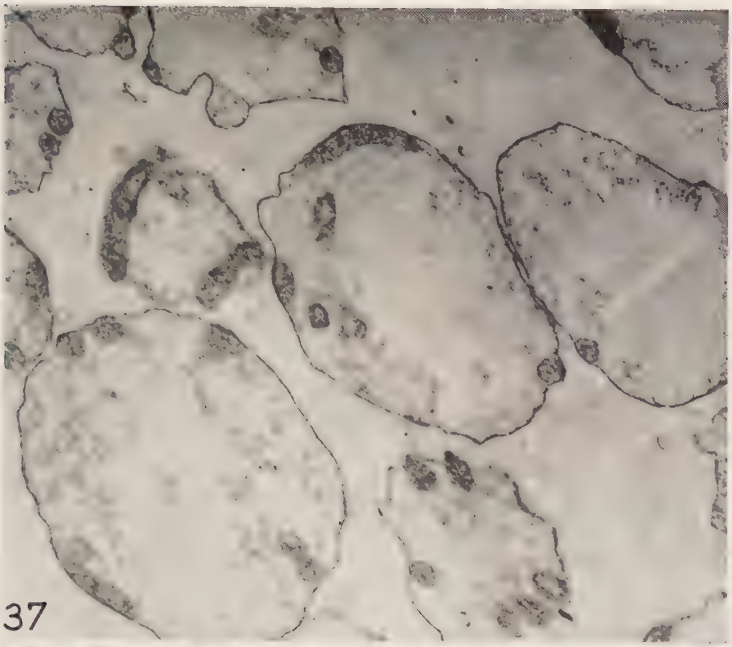
Ces résultats font apparaître une augmentation de la teneur en eau, une diminution des oses et une baisse considérable du taux des acides nucléiques, à la suite de la vésiculation.

L'analyse des lipides effectuée sur des tréponèmes ayant subi quatre lavages, révèle dans les sphéroïdes une teneur en phosphatides beaucoup plus faible que dans les formes hélicoïdales ; de plus, l'analyse chromatographique révèle l'absence dans les sphéroïdes du phosphatidyl-glycérol présent dans la forme hélicoïdale.

Puisqu'une fuite des macromolécules cellulaires accompagne la vésiculation naturelle, on peut penser que, aux tout premiers stades de cette vésiculation, les macromolécules soustraites au milieu interne s'accumulent dans l'interstice enveloppe-corps cellulaire, créant ainsi le courant d'endosmose.

Fig. 35. — Coupes de formes hélicoïdales granuleuses montrant des boursouflures (g) de l'enveloppe, premier stade de la vésiculation chez *T. reiteri*. Gr : 55.000.

Fig. 36. — Coupes de sphéroïdes obtenus après deux mois d'incubation, correspondant au stade terminal de la vésiculation chez *T. reiteri*. L'enveloppe est complètement décollée et le cytoplasme est localement autolysé. Noter le dédoublement de l'enveloppe (d) ; on ne l'observe que dans les vieilles cultures. Gr : 54.000.



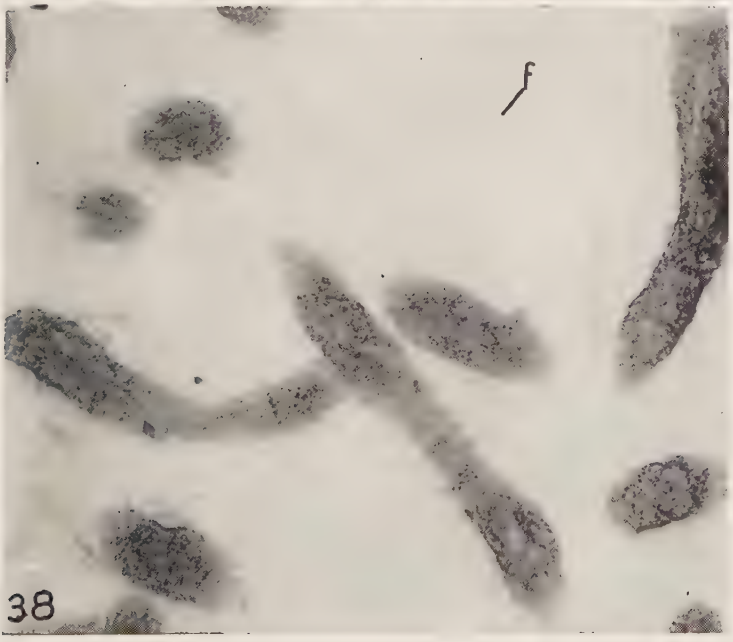


Fig. 37. — Coupes des sphéroïdes obtenus artificiellement, à pH 10. Gr : 36.000.

Fig. 38. — Coupes des corps cellulaires, libérés des sphéroïdes obtenus à pH 10, après action de l'eau saturée de butanol.

L'enveloppe a été dispersée par le traitement. Noter la libération des fibrilles (f).

TABLEAU IV.

Analyse des principaux constituants des formes hélicoïdales et des sphéroïdes naturels de tréponèmes.

Signification des chiffres exprimés	Dosages effectués	Formes hélicoïdales	Sphéroïdes naturels
% du poids humide	Eau	82,5	plus de 92 (*)
% du poids sec	Azote	12,5	13
	Protéines	52	61
	Oses (exprimés en glucose)	12,2	5
	Phosphore total	1,8	0,8
	Phosphore minéral	traces indosables	traces indosables
	Acides nucléiques totaux	19	1,82
	A. R. N.	13,4	0,75
	A. D. N.	5,6	1,07

(*) Ce dosage a été effectué sur des sphéroïdes obtenus précocement dans des conditions de culture peu favorables (milieu au liquide d'ascite) et mélangés à quelques formes hélicoïdales.

F) Etude immunologique.

1) L'état immunologique de la surface.

L'activité antigénique de la surface du sphéroïde de *T. reiteri* obtenu après deux mois d'incubation se révèle différente de celle de la forme hélicoïdale qui lui a donné naissance. Les formes hélicoïdales intactes ne fixent le complément qu'avec le sérum anti-*T. reiteri* et ne le fixent pas avec le sérum du sujet syphilitique. Les sphéroïdes, par contre, fixent le complément avec ces deux sérums. Les lavages répétés à pH 7,2 (véronal 0,005 M, NaCl 0,15 M) soustraient aux formes hélicoïdales une activité antigénique de nature polyosidique et démasquent la protéine de groupe ; l'ultrasonnation démasque cette protéine de groupe plus efficacement que le lavage. Les mêmes lavages effectués sur les sphéroïdes ne retirent que très peu d'activité polyosidique mais solubilisent beaucoup de protéine de groupe, laissant une préparation privée d'une grande partie de ses activités antigéniques ; par ailleurs, l'ultrasonnation ne démasque aucune activité antigénique sous-jacente à la surface, chez les sphéroïdes (tableau V).

2) Etude qualitative et quantitative des antigènes.

Nous avons cherché à identifier des antigènes propres aux formes hélicoïdales d'une part, aux sphéroïdes obtenus après deux mois d'incubation d'autre part, tout en recherchant ce que deviennent les antigènes de la forme hélicoïdale au cours de la vésiculation naturelle,

Dans un premier temps, nous avons étudié l'activité du sérum anti-formes hélicoïdales et du sérum de sujet syphilitique vis-à-vis de préparations de formes hélicoïdales et de sphéroïdes, par l'immunoprécipitation en gel et par la fixation du complément. Cette étude a porté sur des tréponèmes lavés ou non, intacts ou ultrasonnés, sur les surnageants de centrifugation de culture, sur les extraits protéiques et polyosidiques des deux types morphologiques extrêmes.

Tous les antigènes identifiés dans la forme hélicoïdale sont présents dans les sphéroïdes et inversement. Nous retrouvons la protéine de groupe et les antigènes polyosidiques individualisés dans nos précédents travaux (Pillot, Dupouey et Faure, 1960 ; Pillot et Dupouey, 1964). L'activité antigénique, titrée par la fixation du complément, est nettement plus importante dans les formes hélicoïdales. Le surnageant de centrifugation à 20.000 g de cultures de formes hélicoïdales ne possède qu'une activité antigénique négligeable ; par contre, le surnageant de cultures de sphéroïdes possède une activité fixant le complément avec le sérum anti-*T. reiteri*, égale à environ cinq fois celle du culot de centrifugation correspondant.

Ces résultats sont résumés dans le tableau V.

L'appauvrissement des cellules en antigènes et la diffusion de ceux-ci dans le milieu témoignent de l'importance des phénomènes d'autolyse, chez les sphéroïdes naturels. La vésiculation artificielle, à l'inverse de la vésiculation naturelle, ne solubilise qu'une activité antigénique faible.

Dans un second temps, nous avons épuisé l'immunsérum anti-formes hélicoïdales par des quantités progressivement croissantes de sphéroïdes naturels, et inversement ; les formes hélicoïdales avaient été soumises à une autolyse de façon à altérer suffisamment leur surface pour rendre accessibles les antigènes profonds. Les sérums épuisés ont été étudiés comparativement au sérum non épuisé :

— en agglutination et en immunofluorescence indirecte vis-à-vis des formes hélicoïdales et des sphéroïdes, dans leur milieu de culture (pour éviter la perte éventuelle d'un antigène de surface) et en suspension dans l'eau physiologique après 4 lavages à pH 7,2 (véronal 0,005 M, NaCl 0,15 M),

— en fixation du complément vis-à-vis des deux types morphologiques du tréponème, ultrasonné ou non.

Les épuisements partiels des immunsérums montrent que les baisses d'activité vis-à-vis des formes hélicoïdales et des sphéroïdes sont parallèles, quel que soit l'immunsérum ou la préparation antigénique qui épuise. Il n'existe donc aucun antigène dans la forme hélicoïdale qui ne soit décelable dans le sphéroïde naturel, et inversement. Toutefois, à poids égal, les sphéroïdes intacts épuisent mieux les différents anticorps que les formes hélicoïdales intactes.

Les résultats ne montrent, en aucun cas, d'activité résiduelle après épuisement (tableau VI).

TABLEAU V.

Titre antigénique en fixation du complément de préparations de formes hélicoïdales, de sphéroïdes de deux mois d'incubation, et des surnageants de culture correspondants, vis-à-vis de sérum anti-formes hélicoïdales, de sérum anti-sphéroïdes et de sérum de sujet syphilitique.

	Sérum anti-formes hélicoïdales ou anti-sphéroïdes		Sérum de sujet syphilitique	
	1/100	1/400	1/2	1/8
Formes hélicoïdales intactes 20 mg/ml) :				
1/100	++++	+++	—	—
1/400	+++	++	—	—
1/1600	+	+	—	—
Formes hélicoïdales ultrasonnées :				
1/1000	++++	—	++++	++
1/4000	++++	+	++	+
1/1600	+++	+	—	—
1/6400	+	—	—	—
Sphéroïdes intacts (20 mg/ml) :				
1/100	++++	++	++++	++
1/400	+++	+	+	+
1/1600	+	—	—	—
Sphéroïdes ultrasonnés :				
1/100	++++	—	++++	++
1/400	+++	—	+	+
1/1600	+	—	—	—
1/6400	—	—	—	—
Surnageant de centrifugation de culture (formes hélicoïdales) :				
1/1	++	+	—	—
1/4	+	—	—	—
Surnageant de centrifugation de cultures (sphéroïdes) :				
1/1	++++	—	++	—
1/4	++++	—	—	—
1/16	++++	—	—	—
1/64	+	—	—	—

L'importance de la diffusion des antigènes au cours de la vésiculation naturelle est évidente, sachant que les 20 mg/ml mentionnés correspondent au poids sec des tréponèmes d'une culture concentrée 50 fois dans le cas des formes hélicoïdales et 66 à 100 fois dans le cas des sphéroïdes.

TABLEAU VI.

Résultats de l'épuisement d'un sérum anti-formes hélicoïdales par des sphéroïdes et inversement.

	Agglutination		Immuno-fluorescence		Fixation du complément	
	H	S	H	S	H	S
Sérum anti-H ou anti-S :						
1/10	+	+	+	+	++++	++++
1/50	+	+	+	+	++++	++++
1/250	+	+	+	+	+++	+++
1/1250	—	—	+	+	—	—
1/6250	—	—	—	—	—	—
Sérum anti-H épuisé par S ou sérum anti-S épuisé par H :						
1/10	—	—	—	—	—	—
1/50	—	—	—	—	—	—
1/250	—	—	—	—	—	—
1/1250	—	—	—	—	—	—
1/6250	—	—	—	—	—	—

H = formes hélicoïdales S = sphéroïdes.

L'agglutination est effectuée avec des tréponèmes lavés ; les titres sont trois fois plus élevés si les tréponèmes sont utilisés dans leur propre milieu de culture. Pour la fixation du complément, l'antigène est constitué par une suspension de tréponèmes intacts ; les résultats sont les mêmes avec la concentration optimale pour le système homologue ou avec des concentrations supérieures. L'ultrasonnation de cet antigène ne modifie pas le schéma de la fixation.

Chez les sphéroïdes naturels, tous les antigènes sont d'emblée facilement accessibles aux différents anticorps ; ceci est une preuve supplémentaire de l'altération de la barrière cellulaire chez ces sphéroïdes.

G) Physiologie de la vésiculation naturelle.

L'étude de la vésiculation qui survient naturellement en culture nous conduit, avec *T. reiteri,* aux constatations suivantes.

1°. Dans les milieux favorables (milieu de base correct et sérum peu ou pas agglutinant), avec repiquage tous les trois ou quatre jours ou en culture continue, les formes hélicoïdales vésiculées et les sphéroïdes sont exceptionnels, de l'ordre de 10^{-5} par rapport aux formes hélicoïdales typiques.

2°. L'ensemencement d'un milieu défavorable (anaérobiose insuffisante, milieu déficient en substances réductrices, milieu hypersalé ou glycériné, milieu où le sérum est remplacé par de l'ascite...) avec un

inoculum provenant d'une culture effectuée dans les conditions optimales et prélevé durant la phase de multiplication exponentielle, aboutit à la formation rapide de forme hélicoïdales vésiculées et de sphéroïdes. Dans ces conditions, la réduction du taux de croissance va de pair, dès le départ, avec une grande hétérogénéité de la morphologie comportant des formes hélicoïdales plus longues et des sphéroïdes plus volumineux.

3°. Une culture homogène de formes hélicoïdales placée, au cours de la phase exponentielle de croissance, à une température inférieure au seuil de multiplication du tréponème (25° environ), conserve longtemps sa mobilité et ne forme pas de vésicule. Il en est de même des tréponèmes privés de source énergétique dans des conditions de survie favorable ; ainsi, inoculés dans un milieu sans glucose additionné d'albumine ou de sérum dialysé, les tréponèmes restent longtemps mobiles à 37° sans former de vésicules.

4°. Si des tréponèmes en phase exponentielle de croissance sont repris dans un milieu sans sérum, la vésiculation totale est réalisée en quelques heures à 37°, en quelques jours à 22° ; dans ces conditions, l'absence de glucose n'empêche pas la vésiculation.

5°. Quelques formes hélicoïdales vésiculées ou des sphéroïdes apparaîssent dès le départ, dans un milieu neuf favorable, si ce dernier est ensemencé avec une culture effectuée sur le même milieu mais ayant atteint ou dépassé la phase stationnaire de fin de croissance ; le nombre de formes non hélicoïdales est d'autant plus grand pendant la phase de latence et au départ de la subculture que l'inoculum était plus âgé. Tout se passe comme si l'altération des cellules qui survient en fin de croissance ne régressait pas dans le milieu neuf.

La vésiculation en culture apparaît donc étroitement liée à des conditions de croissance défavorables : défaut de substances essentielles (excepté la carence en glucose) ou excès de substance inhibitrices. Elle n'est donc qu'un signe de souffrance cellulaire.

II. Les formes granuleuses.

Nous avons décrit ci-dessus les conditions d'apparition des granules sur les formes hélicoïdales de *T. reiteri*, au début du phénomène de vésiculation. La signification de ces granules se comprend pleinement en suivant le déroulement de la vésiculation artificielle à pH 10, de préférencë en microscopie interférentielle, et en examinant des coupes de formes hélicoïdales granuleuses au microscope électronique : le granule correspond au tout premier stade du décollement de l'enveloppe. Chez les autres tréponèmes, les borrelia et les leptospires, nous constatons que des phénomènes identiques précèdent la vésiculation. Nous n'avons jamais observé la libération de ces granules dans le milieu, à partir de la forme hélicoïdale, comme on cru le voir certains auteurs.

Les granules observés à la surface des tréponèmes ne répondent pas toujours à cette définitition ; on observe souvent la présence de gra-

nules, parfois rassemblés en calotte, à la surface des sphéroïdes. Avec le micromanipulateur on peut enlever aisément ces granules, en laissant le sphéroïde nu et apparemment intact. Il s'agit, dans le cas de ces granules, de produits du milieu de culture adsorbés sur les tréponèmes.

La présence de granules libres dans les cultures débutantes de *T. reiteri* a toujours pu être rapportée à une précipitation de milieux insuffisamment stables. L'immunisation du lapin avec de tels « granules » séparés par des centrifugations différentielles, nous a surtout donné des anticorps précipitants anti-milieu de culture.

Dans les vieilles cultures, et comparativement à des milieux non ensemencés rigoureusement stables, il est toujours possible de retrouver des granules dans des milieux qui en sont dépourvus au moment de l'ensemencement. De tels granules ne semblent provenir que d'une désintégration de certains tréponèmes. En effet, la dispersion et la diffusion de substances tréponémiques commencent dès la fin de la phase exponentielle de croissance : le surnageant de centrifugation à 20.000 g d'une culture en fin de phase exponentielle s'avère déjà immunogène pour le lapin.

Ces observations relatives à l'absence d'une phase granulaire chez *T. reiteri* sont en accord avec les travaux de Heisch et Harvey (1962), de Haberkorn (1963) ; ces auteurs ont montré que chez des poux infestés par des borrelia, il n'y avait aucune phase granulaire virulente chez cet insecte, comme l'avait initialement pensé Nicolle et Blanc (1914).

III. Les foyers de multiplication.

Dans l'heure qui suit l'inoculation d'un milieu neuf avec des formes hélicoïdales libres de *T. reiteri,* nous retrouvons des groupes de deux à trois formes hélicoïdales mobiles enchevêtrées qui, selon les cas et avec le temps, peuvent évoluer en vésicules dites « germinatives », en microcolonies et même en colonies macroscopiquement visibles au fond des tubes. Dès qu'il excède une douzaine de tréponèmes et s'il est suffisamment dense, l'agglutinat prend alors un aspect granulaire en son centre ; microcolonies et colonies revêtent l'aspect d'une masse de granules avec des tréponèmes mobiles irradiant à la périphérie. La dissociation avec le micromanipulateur des vésicules dites « germinatives », des microcolonies et des colonies, ne libèrent pas de granules mais seulement des formes hélicoïdales et éventuellement des sphéroïdes.

Dans un précédent mémoire (Pillot, 1962), nous avons montré que les sérums indispensables à la croissance (utilisés à la concentration de 10-20 pour 100) étaient à l'origine de telles associations chez les tréponèmes. Nous avons précisé la nature du facteur sérique en cause et montré qu'il s'agissait d'un anticorps anti-tréponèmes que nous avons caractérisé par l'agglutination, l'immunofluorescence indi-

recte, l'immunoprécipitation en gel et l'hémagglutination conditionnée. Dans la genèse des foyers de multiplication, le rôle de cet anticorps se reconnaît sur les faits suivants.

1°. Les foyers de multiplication apparaissent d'autant plus rapidement après l'inoculation, et sont par la suite d'autant plus volumineux, que le sérum ajouté au milieu est plus agglutinant ou que la quantité de sérum ajoutée au milieu est plus importante.

2°. On ne retrouve plus les foyers de multiplication si l'on épuise préalablement le sérum avec les tréponèmes que l'on veut cultiver, si l'on réensemence le filtrat d'une culture en phase exponentielle de croissance, ou si l'on remplace le sérum du milieu par sa fraction albuminique.

3°. On les observe de nouveau si l'on ajoute de l'immunsérum de lapin anti-*T. reiteri* à un milieu de culture non agglutinant pour lui conférer le titre agglutinant des milieux usuels.

4°. Les foyers de multiplication sont d'autant plus nombreux que les milieux de culture sont moins aptes à assurer la croissance, c'est-à-dire qu'il y a moins d'antigène néoformé pour saturer l'anticorps présent. Le liquide d'ascite, substitué au sérum pour la culture, bien que n'assurant qu'une croissance défectueuse par rapport à ce dernier, ne donne pas de foyers de multiplication parce qu'il ne contient pas d'anticorps.

Ces observations faites avec *T. reiteri* semblent valables pour la plupart des *Spirochaetales* cultivables *in vitro*. En effet, tous les tréponèmes étudiés (*T. minutum, T. phagedenis, T. vincentii*) et *L. icterohemorrhagiae* sont agglutinés par les sérums normaux. Chaque fois que nous l'avons recherchée, nous avons trouvé une relation entre la présence de foyers de multiplication et celle de l'anticorps naturel des sérums. Nous pensons qu'il s'agit d'un anticorps élaboré à un taux faible vis-à-vis de chaque espèce de *Spirochaetales*, l'individu étant ou ayant été en contact avec cette *Spirochaetale* ou avec une *Spirochaetale* antigéniquement apparentée.

Conclusions.

1°. Les formes « rondes » ne sont que le résultat du décollement progressif de l'enveloppe, dû à une hyperhydratation de l'interstice enveloppe-corps cellulaire et consécutif à des conditions défavorables du milieu.

Ces formes « rondes » ne représentent donc, ni des formes de résistance, ni les éléments d'un cycle évolutif obligatoire ; elles ne résultent que de la dégénérescence de la forme hélicoïdale qui, seule, est fonctionnelle.

2°. Les granules présents sur les formes hélicoïdales correspondent à un décollement très localisé de l'enveloppe. Les granules libres ne sont que des produits d'autolyse de *Spirochaetales*.

3°. Les colonies de *Spirochaetales* de toutes dimensions, dites foyers de multiplication, sont des amas dans lesquels les cellules en division sont maintenues agglutinées par un anticorps naturel anti-*Spirochaetale* présent dans tous les sérums ajoutés obligatoirement, parce que nécessaires à la culture.

Il n'existe donc pas de cycle évolutif chez les *Spirochaetales* ; celles-ci ne se multiplient que par division transversale de la forme hélicoïdale, comme c'est la règle chez les bactéries.

CHAPITRE V.

LA STRUCTURE DE *TREPONEMA REITERI*.

Cette partie du travail a pour but de proposer et de justifier, pour les différents revêtements du tréponème, une terminologie équivalente à celle utilisée pour désigner les structures correspondantes des autres procaryotes.

I. Caractéristiques physiques de l'enveloppe et de la membrane.

1) L'ENVELOPPE.

— L'enveloppe est transparente à la lumière puisqu'on perçoit au microscope optique, à l'intérieur du sphéroïde, le corps cellulaire plus ou moins replié sur lui-même.

— L'enveloppe est souple et élastique. Elle participe à toutes les déformations sinusoïdales de l'hélice autour de son axe longitudinal, qui surviennent lors du déplacement du tréponème. Elle est à l'origine des divers aspects morphologiques qui apparaîssent au cours de la vésiculation (chapitre IV). Par la micromanipulation, il est possible de faire passer des sphéroïdes dans des canalicules dont le diamètre est environ quatre fois plus petit que celui des sphéroïdes ; le sphéroïde retrouve son aspect initial à la sortie du canalicule. Le revêtement externe des sphéroïdes se comprime aisément et, si l'on cesse la pression, il reprend sa position de départ ; on ne le perfore que difficilement en accentuant la pression.

— L'enveloppe externe est peu résistante. Comme nous l'avons déjà mentionné (chapitre IV), deux lavages en eau physiologique tamponnée à pH 7,2 suffisent à démasquer l'activité de l'antigène protéique de groupe, donc à créer des brèches dans la continuité de cette enveloppe ; de telles brèches apparaissent rapidement au cours de la vésiculation naturelle.

— L'enveloppe est imperméable aux macromolécules. Nous avons déjà mentionné son imperméabilité aux anticorps. Les grosses molécules ($M > 40.000$) en solutions concentrées, préviennent la vésiculation naturelle et artificielle et provoquent la rétraction des sphéroïdes. Au contraire, l'enveloppe est perméable aux petites molécules : les sphéroïdes ne se rétractent pas lorsqu'on les place en solutions concentrées de sucres ou de NaCl (voir chapitre IV).

Les caractères physiques, à eux seuls, permettent déjà d'établir une distinction nette entre le revêtement le plus externe des tréponèmes et celui des eubactéries capsulées ; la capsule des eubactéries ne présente en effet aucune plasticité.

2) La membrane.

— Certains des faits qui témoignent de la souplesse de l'enveloppe impliquent également la présence d'une relative souplesse au niveau de la membrane entourant le cytoplasme. Les *Spirochaetales* sont des cellules flexibles ; nous ne retrouvons pas chez eux une paroi aussi rigide que celle des eubactéries.

— A la différence de l'enveloppe, la membrane entourant le cytoplasme est, chez les tréponèmes, une membrane résistante. En effet, comme nous l'avons mentionné au chapitre IV, le corps cellulaire libéré de son enveloppe persiste sans grande modification (fig. 33 C ; fig. 38), conservant notamment sa morphologie grossièrement hélicoïdale.

II. Caractéristiques chimiques de l'enveloppe et de la membrane.

A) Sensibilité *in situ* aux enzymes et à certains agents chimiques.

1) L'enveloppe.

La sensibilité de l'enveloppe est appréciée selon deux procédés. D'une part, on cherche à libérer le corps cellulaire contenu dans les sphéroïdes artificiels ; cette libération implique la destruction de l'enveloppe par le réactif. D'autre part, on explore la capacité des formes hélicoïdales traitées à former des vésicules ; l'impossibilité de provoquer une vésiculation témoigne d'une altération de l'enveloppe consécutive au traitement.

L'enveloppe est insensible au lysozyme (même en présence de versène), aux enzymes protéolytiques (papaïne, trypsine), à la lipase, à la ribonucléase ; elle est par contre sensible au suc digestif de l'escargot qui est constitué d'un mélange d'une trentaine d'enzymes, tous glucidolytiques. Cette sensibilité montre que des polyosides participent à la constitution de l'enveloppe.

L'enveloppe est, d'autre part, sensible à un certain nombre d'agents chimiques qui ont en commun la propriété d'agir sur des substrats lipidiques.

Le toluène à saturation provoque lentement la transformation des formes hélicoïdales en disques plats, les deux extrémités du corps cellulaire se rapprochant l'une de l'autre ; la transparence de l'enveloppe est très augmentée et on perçoit alors, plus nettement, le corps cellulaire sous-tendant le disque sur la plus grande partie de la périphérie. L'eau saturée de butanol est plus active que l'eau saturée de toluène. Les sels biliaires (taurocholate de sodium), les agents tensioactifs (lauryl-sulfate, teepol...) sont très actifs ; à des concentrations inférieures à 2 mg/ml, ils dispersent d'emblée la totalité des constituants de l'enveloppe.

2) La membrane.

La sensibilité de la membrane est appréciée sur les corps cellulaires ; ceux-ci sont obtenus après dispersion de l'enveloppe des sphéroïdes par l'eau saturée de butanol. La membrane est insensible aux

enzymes précédemment mentionnés dans l'étude de l'enveloppe. Elle est également insensible à l'eau saturée de toluène, à l'eau saturée de butanol et elle résiste bien à l'action des sels biliaires et des agents tensio-actifs.

Cette résistance de la membrane entourant le cytoplasme est très caractéristique des tréponèmes. La membrane cytoplasmique des eubactéries est relativement sensible à la trypsine, à la lipase, à la ribonucléase et aux agents tensio-actifs, à en juger par l'action de ces enzymes sur les protoplastes (McQuillen, in Gunsalus and Stanier, 1960) ; elle est en particulier très sensible à l'action du laurylsulfate puisque ce dernier est le meilleur agent de dispersion des fragments de membrane cytoplasmique au cours de la préparation des parois bactériennes (Kellenberger et Ryter, 1964). Enfin, nous constatons que cette différence de comportement entre la membrane limitant le cytoplasme des tréponèmes et la membrane cytoplasmique des eubactéries, se retrouve vis-à-vis de l'eau saturée de butanol ; le traitement d'*E. coli* par l'eau saturée de butanol aboutit à la désorganisation de la membrane cytoplasmique (fig. 39), ce qui implique d'ailleurs le passage du solvant à travers la paroi ; la membrane limitant le cytoplasme chez le tréponème n'est pas affectée par ce traitement (fig. 38). Bien que ces deux membranes présentent le même aspect au microscope électronique, il est donc impossible de les considérer comme ayant essentiellement la même structure.

B) Recherche et localisation du glycosaminopeptide.

1) Identification chimique et dosage.

La recherche du glycosaminopeptide responsable de la rigidité de la paroi bactérienne, a été effectuée parallèlement, sur le tréponème entier, sur l'enveloppe et sur le corps cellulaire.

Enveloppes et corps cellulaires ont été préparés de la façon suivante. Les tréponèmes en phase exponentielle de croissance (trois jours d'incubation) sont centrifugés une heure à 5.000 *g*. Le culot est repris, progressivement et en homogénéisant doucement avec des billes de verre, par un volume de tampon au borate de sodium 0,05 M, de pH 10, représentant le 1/10 du volume de la culture. On incube une heure à 37° C ; la presque totalité des formes hélicoïdales est alors transformée en sphéroïdes ; on ramène le pH à 7,5 ; on centrifuge une heure à 10.000 *g* ; le culot est repris comme précédemment par un demi-volume d'eau saturé de butanol. On s'assure que les filaments hélicoïdaux ont été libérés et on dialyse en eau distillée à + 4°C avec une agitation douce. Après environ 36 heures de dialyse, on centrifuge la préparation à 10.000 *g* ; le surnageant contient les produits de dispersion de l'enveloppe et le culot, les corps cellulaires ; on lyophilise chaque fraction.

La mise au point de cette méthode de préparation des enveloppes et des corps cellulaires a été contrôlée par des techniques immunologiques qui seront exposées ultérieurement (contrôle immunologique et chimique de l'extraction de l'enveloppe, III B). Celles-ci ont comporté l'utilisation, conjointement, d'un anticorps réagissant avec l'enveloppe et d'un anticorps réagissant avec le corps cellulaire.

Le fractionnement (Ginger, 1963) a comporté les stades suivants.

— Une extraction à reflux des lipides par un mélange chloroforme-méthanol à parties égales.

— Un traitement du résidu par l'acide trichloracétique à 5 pour 100, à 0°C, pour éliminer les nucléotides solubles, les produits du métabolisme intermédiaire, les polyosides et éventuellement les acides teichoïques.

— Un traitement par la potasse 0,3 N à 37°C pour solubiliser l'A.R.N., puis un second traitement par l'acide trichloracétique à 5 pour 100, à 70°C, pour solubiliser l'A.D.N.

— Une digestion trypsique puis pepsique du résidu pour éliminer les protéines.

— Une hydrolyse par HCl 4 N de l'insoluble et une séparation chromatographique des sucres aminés sur résines acides. La séparation de l'acide muramique de la glucosamine est effectuée par chromatographie sur une colonne d'un mélange charbon-célite.

TABLEAU VII.

Fractionnement des cellules de T. reiteri *et localisation du glycosaminopeptide.*

	Tréponèmes entiers		Enveloppes		Corps cellulaires	
	mg	%	mg	%	mg	%
1°) Poids initial du produit soumis au traitement.....	710	100	689	100	745	100
2°) Extraits:						
Soluble dans le chloroforme-méthanol.....	160	22,5	111	16,1	144	19,2
Soluble dans la potasse et l'acide trichloracétique	341	48	269	39	390	52,3
Soluble après digestion trypsique et pepsique.	124,9	17,5	306,4	44,4	174,6	23,4
Résidu susceptible de contenir le glycosaminopeptide.....	84,1	11,8	2,59	0,38	55,4	7,4
3°) Analyse du résidu:						
Acide muramique.....	0,445	0,19	0	0	0,41	0,20
Glucosamine.....	0,710		0	0	0,775	

Les enveloppes et les corps cellulaires ont été séparés par action de l'eau saturée de butanol sur les sphéroïdes obtenus à pH 10. Les chiffres représentent les poids secs.

Les résultats de l'analyse aux différents stades du fractionnement sont donnés dans le tableau VII. Le glycosaminopeptide est présent à un taux très faible chez *T. reiteri* ; la quantité dosée de glucosamine et d'acide muramique ne représente que 0,20 pour 100 environ du poids du germe. Le glycosaminopeptide reste intimement lié au corps cellulaire, et selon toute vraisemblance à la membrane limitant le cytoplasme. L'enveloppe est complètement dépourvue de glycosaminopeptide, ce qui, compte tenu de ses caractères physiques, confirme la validité de la terminologie « enveloppe » que nous employons pour désigner le revêtement le plus externe de la cellule.

Le glycosaminopeptide du tréponème présente une particularité : il contient deux fois plus de glucosamine que d'acide muramique ; sa composition serait donc différente de celle du glycosaminopeptide des eubactéries dont l'hydrolyse libère, en général, approximativement autant de glucosamine que d'acide muramique.

2) Identification anatomique.

Cette liaison du glycosaminopeptide au corps cellulaire nous a conduit, d'une part à préciser sa localisation en étudiant l'altération cellulaire provoquée par la pénicilline ajoutée dans les cultures, d'autre part à analyser l'influence sur la croissance des tréponèmes, de cet antibiotique ainsi que d'un autre inhibiteur de la biosynthèse du glycosaminopeptide (Strominger, 1962).

Dans une culture ayant atteint le tiers environ de sa croissance, après 48 heures d'incubation, nous avons ajouté de la pénicilline de façon à obtenir des concentrations de 0,5 à 50 unités par ml. Après deux à trois heures, chaque tréponème se présente, au microscope à contraste de phase ou interférentiel, sous l'aspect d'un filament hélicoïdal portant une granulation très dense entourée souvent d'une vésicule très transparente. La granulation augmente de volume à l'intérieur de la vésicule au cours de l'incubation, atteignant après 24 heures un diamètre six à huit fois plus grand que celui du tréponème normal. Les tréponèmes conservent leur motilité et leur reproductibilité pendant plusieurs jours, puis ils s'immobilisent progressivement et l'altération demeure stable.

Comme le montre la microscopie électronique (fig. 40 et 41), cette granulation correspond à une hernie volumineuse et dense du cytoplasme. Une telle hernie ne peut être due qu'à une baisse de la résistance de la membrane limitant le cytoplasme, cette dernière refoulant l'enveloppe à son contact ou à une certaine distance. Cet aspect est bien différent de la vésiculation qui comporte un décollement et probablement une dilatation de la seule enveloppe externe. La dilatation localisée du corps cellulaire correspond à la granulation que l'on observe en microscopie optique et l'enveloppe correspond au halo.

Ces lésions ne sont pas d'emblée léthales pour les tréponèmes. Elles apparaissent déjà chez des tréponèmes inoculés dans un milieu neuf contenant une concentration de pénicilline deux à quatre fois plus faible que la concentration minimale inhibitrice (cette concentration

minimale inhibitrice est de l'ordre de 0,03 u/ml dans nos conditions de culture). De plus, nous avons vu que les tréponèmes demeurent mobiles et repiquables pendant plusieurs jours, en présence de concentrations aussi élevées que 50 u/ml de pénicilline. Par ailleurs, les courbes de croissance (fig. 42) révèlent qu'après adjonction de doses suffisantes de pénicilline, la croissance pondérale n'est pas complètement arrêtée durant les 48 premières heures, malgré l'altération des cellules ; par contre, la division cellulaire est pratiquement bloquée.

La pénicilline que l'on sait perturber la biosynthèse du glycosaminopeptide, affecte donc essentiellement, chez les tréponèmes, la résistance de la membrane entourant le cytoplasme. L'analogie est évidente avec ce qui se passe au niveau de la paroi, chez les bactéries à Gram négatif. Chez les tréponèmes, le glycosaminopeptide est donc associé à la membrane limitant le cytoplame ; celle-ci présente à la fois les caractères de la paroi et de la membrane cytoplasmique des bactéries ; nous la dénommerons désormais membrane « pariéto-cytoplasmique ».

Nous avons essayé de compenser la défaillance mécanique de la membrane pariéto-cytoplasmique induite par la pénicilline, en augmentant la tonicité du milieu par le saccharose, par différents sels, par des macromolécules (albumine, dextrane), dans des conditions qui seraient compatibles avec la multiplication en l'absence de pénicilline. Nous n'avons jamais obtenu de culture dans ces milieux pénicillinés et hypertoniques et nous avons retrouvé constamment chez les tréponèmes inoculés, la lésion caractéristique de la présence de pénicilline.

On sait que la bacitracine, comme la pénicilline, agit sur le dernier stade de la chaîne de biosynthèse du glycosaminopeptide (Stromin-ger, 1962) ; elle donne sur *T. reiteri* des lésions analogues à celles de

---

Fig. 39. — Coupe d'*E. coli* après traitement par l'eau saturée de butanol. La paroi (p) n'a pas subi de modification tandis que la membrane cytoplasmique a été désorganisée et a disparu. On retrouve des structures lamellaires intracytoplasmiques qui sont probablement des mésosomes ayant échappé au traitement du fait de leur situation interne. Gr : 100.000.

Fig. 40. — Coupe de *T. reiteri*, en culture avec 50 u/ml de pénicilline depuis 24 heures. La coupe passe au niveau de la granulation visible au microscope optique. On voit que cette granulation correspond à une hernie volumineuse et dense du cytoplasme ; cette hernie ne peut être due qu'à une diminution de la résistance de la membrane limitant le cytoplasme. Le corps cellulaire (c.c) ne semble pas modifié. Ici, enveloppe et membrane sont constamment en contact. Toutefois, surtout au début, l'enveloppe décollée peut être refoulée à une certaine distance de la membrane ; elle correspond alors à la vésicule transparente que l'on voit au microscope optique entourant la granulation. Gr : 55.000.

Fig. 41. — *T. reiteri*, en culture avec 50 u/ml de pénicilline depuis 24 heures. Constraste négatif. On note la volumineuse hernie partant du corps cellulaire et contenant apparemment du matériel cytoplasmique. Gr : 39.000.

39

40

41

la pénicilline. En présence de bacitracine comme de pénicilline, le tréponème n'est pas cultivable dans des milieux hypertoniques.

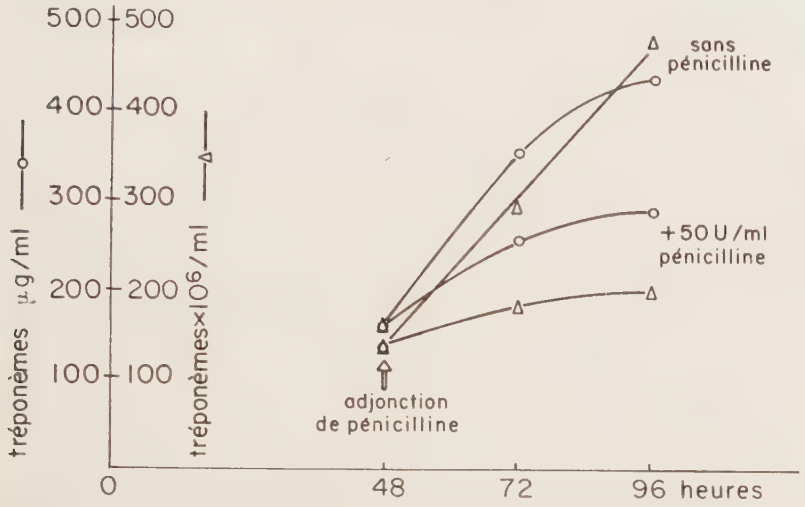


Fig. 42. — Courbe de croissance de *T. reiteri* en présence de pénicilline ajoutée 48 heures après l'ensemencement.

III. Analyse immunochimique.

A) Caractéristiques immunologiques de la cellule entière.

Les cellules intactes de *T. reiteri* (cellules jeunes, fraîchement récoltées) ne sont pas agglutinées par les immun-anticorps anti-*T. minutum* et anti-T. *pallidum* ; dans les mêmes conditions, la réaction de fixation du complément est négative. Avec des formes hélicoïdales dont l'enveloppe cellulaire a été altérée (lavages, autolyse) et avec des sphéroïdes obtenus après deux mois d'incubation chez lesquels les barrières cellulaires sont devenues perméables aux macromolécules, l'agglutination est tout aussi spécifique qu'avec les cellules intactes. Par contre, la fixation du complément a perdu sa spécificité d'espèce : *T. reiteri* fixe alors le complément en présence des sérums anti-*T. minutum* et anti-*T. pallidum* ; cette fixation est rendue possible par l'altération de l'enveloppe qui donne aux anticorps l'accès à la protéine de groupe. Les expériences d'épuisement sont en accord avec ces faits : les sérums anti-*T. minutum* et anti-*T. pallidum* ne perdent leur activité fixant le complément avec *T. reiteri* qu'après épuisement par des cellules dont l'enveloppe est altérée.

Ces résultats nous conduisent à deux conclusions.

1°. la spécificité immunologique est plus marquée au niveau de l'enveloppe qu'au niveau du corps cellulaire,

2°. la réaction d'agglutination ne met en évidence que les antigènes superficiels. Les antigènes profonds sont accessibles aux anticorps comme le montre la fixation du complément, mais ceux-ci ne peuvent pas pour autant assurer une liaison entre deux cellules et il n'y a pas d'agglutination.

Chez *T. reiteri* la spécificité immunologique de l'enveloppe n'est toutefois pas absolue. D'une part, les sérums normaux de mammifères aux faibles dilutions agglutinent ce tréponème (Pillot, 1962). D'autre part, nous avons récemment mis en évidence chez 0,05 à 0,5 pour 100 des humains normaux, en dehors de toute infection tréponémique caractérisée, l'existence d'un anticorps qui fixe le complément avec un polyoside de *T. reiteri* (Pillot, Betz, Colombani et Ripault, 1965). L'intérêt expérimental de cet anticorps fixant le complément réside, comme nous allons le voir, dans le fait qu'il réagit spécifiquement avec un constituant polyosidique de l'enveloppe. Nous dénommerons cet anticorps, « anticorps naturel antipolyoside ».

B) Contrôle immunologique et chimique de l'extraction de l'enveloppe. Composition chimique de l'enveloppe.

Par la fixation du complément nous avons étudié l'activité immunologique de préparations de *T. reiteri* aux différents stades conduisant à la dispersion de l'enveloppe et à sa séparation du corps cellulaire. Cette activité a été analysée avec l'anticorps naturel antipolyoside d'enveloppe d'une part, un sérum anti-*T. pallidum* réagissant avec la protéine de groupe située sous l'enveloppe d'autre part.

Dans le tableau VIII sont rapportés les résultats obtenus après vésiculation à pH 10 puis solubilisation de l'enveloppe par l'eau saturée de butanol, dans les conditions mentionnées lors de l'étude du glycosaminopeptide. Ces résultats sont comparés à l'activité immunologique des tréponèmes intacts, des tréponèmes ultrasonnés qui contiennent tous les antigènes sous une forme directement accessible aux anticorps, et des sphéroïdes obtenus par choc osmotique (*).

Les résultats obtenus permettent de préciser les points suivants.

1°. L'antigène protéique de groupe sous-jacent à l'enveloppe et de ce fait masqué à l'anticorps correspondant dans la cellule intacte, est révélé en totalité dans l'ultrasonnat ou chez les sphéroïdes obtenus par choc osmotique ; il y a donc altération de l'enveloppe au cours du choc osmotique. Par contre, cet antigène reste inacessible chez les sphéroïdes obtenus à pH 10.

Seule, la vésiculation artificielle réalisée à pH 10, est donc susceptible de respecter une intégrité relative de l'enveloppe.

(*) Le choc osmotique est réalisé en dispersant un culot de formes hélicoïdales dans une solution de NaCl à 17 pour 100, sous un volume équivalent à environ le 1/10 de la culture initiale. On centrifuge et on lave rapidement dans un même volume d'eau distillée. Après centrifugation, on reprend à nouveau en eau distillée.

TABLEAU VIII.

Titrage par réaction de fixation du complément de l'activité antigénique des différentes préparations de T. reiteri *aux stades successifs du fractionnement des enveloppes et des corps cellulaires.*

Préparations antigéniques (1)			Sérum de lapin anti-*T. reiteri*		Sérum antiprotéine de groupe (2)		Anticorps naturel antipolyoside (3)	
Nature		Dilutions	1/100	1/400	1/4	1/16	1/2	1/8
Suspension de *T. reiteri*	Cellules intactes	1/10	++++	+	−	−	−	−
		1/30	++++	+	−	−	++++	+
		1/90	++++	+	−	−	+++	++
		1/270	+++	−	−	−	+++	+
		1/810	−	−	−	−	−	−
	Après ultrasonnation	1/10	+++	−	+++	−	−	−
		1/30	+++	−	+++	++	−	+
		1/90	+++	+	++	−	++	++
		1/270	+++	++	−	−	+++	++
		1/810	++	+	−	−	++	+
Suspension de *T. reiteri* après transformation en sphéroïdes provoquée	Par choc osmotique	1/10	+++	+	++	+++	+++	−
		1/30	+++	+	+++	+++	+++	+
		1/90	+++	++	+++	++	+++	++
		1/270	+++	+	−	−	++	+
		1/810	−	−	−	−	−	−
	Par traitement alcalin à pH 10	1/10	++++	+	−	−	−	−
		1/30	+++	+	−	−	+++	+
		1/90	++++	+	−	−	+++	++
		1/270	+++	−	−	−	+++	+
		1/810	−	−	−	−	−	−
Préparation de sphéroïdes obtenus à pH 10 traitée par l'eau saturée de butanol et centrifugée à 10.000 *g*	Surnageant (enveloppes)	1/10	++++	−	−	−	−	−
		1/30	++++	−	−	−	++	+
		1/90	++++	+	−	−	++++	++
		1/270	++	−	−	−	+++	−
		1/810	−	−	−	−	−	−
	Culot (corps cellulaires)	1/10	++++	+++	++++	+	++	+
		1/30	+++	+++	++++	+++	++++	++
		1/90	++++	+++	++	−	−	−
		1/270	+++	−	−	−	−	−
		1/810	−	−	−	−	−	−

(1) Toutes les préparations antigéniques ont été préparées à partir d'une suspension de *T. reiteri* contenant 2,5 mg/ml de poids sec de tréponèmes.
(2) Le sérum utilisé est un sérum humain d'individu syphilitique.
(3) Cet anticorps naturel antipolyoside existe dans 0,05 à 0,5 p. 100 des sérums d'individus humains normaux.

2°. L'activité de l'antigène protéique de groupe, masquée par l'enveloppe dans les sphéroïdes obtenus à pH 10, réapparaît quantitativement après traitement de ces derniers par l'eau saturée de butanol. Ce traitement libère le corps cellulaire (fig. 33 C) ; après centrifugation, les images du culot obtenues au microscope électronique montrent que la cellule a été dépouillée de son enveloppe par le traitement (fig. 38).

Puisque toute l'activité antigénique protéique de groupe est retrouvée dans le culot de centrifugation contenant les corps cellulaires et qu'il n'y a pas cette activité dans la fraction soluble, l'antigène protéique de groupe est donc strictement lié au corps cellulaire.

3°. Le traitement par l'eau saturée de butanol solubilise environ les trois-quarts de l'antigène réagissant avec l'anticorps naturel antipolyoside. En effet, l'optimum antigénique qui correspond approximativement au rapport d'équivalence entre l'antigène et l'anticorps de ce système polyoside-antipolyoside, est obtenu avec la préparation d'enveloppes (surnageant) diluée à $\frac{1}{90}$, et avec celle des corps cellulaires (culot) diluée seulement à $\frac{1}{30}$. Nous considérons que l'activité antigénique polyosidique qui persiste dans la fraction insoluble est due à une impureté ; celle-ci ne peut-être retirée par lavage des corps cellulaires sans que l'on solubilise en même temps des constituants cytoplasmiques et notamment une partie de la protéine de groupe.

L'antigène polyosidique réagissant avec l'antipolyoside naturel est donc localisé dans l'enveloppe.

Le traitement successif des formes hélicoïdales à pH 10, puis par l'eau saturée de butanol, est le seul qui nous ait permis une séparation nette des activités antigéniques polyosidiques et protéiques. La lyse des sphéroïdes obtenus par choc osmotique, avec l'eau saturée de butanol, solubilise en même temps que l'antigène d'enveloppe une certaine quantité de protéine de groupe. Il en est de même si on lyse les sphéroïdes avec les concentrations minimales actives de lauryl-sulfate ou de taurocholate de sodium.

Les résultats de l'analyse chimique des principaux constituants de l'enveloppe et du corps cellulaire, séparés dans ces conditions, sont mentionnés dans le tableau IX. L'enveloppe contient moins de protéines et davantage d'oses et de lipides que le sphéroïde ou le corps cellulaire. Elle représente en poids, environ 28 pour 100 du poids sec du sphéroïde.

Nous avons constaté que notre préparation d'enveloppes contient un peu d'A.R.N. et des traces d'A.D.N. (réaction à la diphénylamine). Ceci indique que les constituants analysés dans cette expérience ne proviennent pas uniquement de l'enveloppe mais que l'eau saturée de butanol extrait aussi, selon cette méthode, quelques constituants cytoplasmiques.

C'est pourquoi nous avons cherché à modifier la technique de préparation des fractions cellulaires afin d'éviter l'extraction de constituants cytoplasmiques,

TABLEAU IX.

Analyse exprimée en pourcentage, des principaux constituants du sphéroïde, de l'enveloppe et du corps cellulaire, obtenus après vésiculation artificielle à pH 10 et action de l'eau saturée de butanol.

Préparations de *T. reiteri*	Sphéroïde	Enveloppe	Corps cellulaire
Poids sec relatif (%)	100	28 (*)	59 (*)
Constituants (%) :			
N	10	8	11,5
P	2,1	2,1	2,1
Protéines	52,5	35,5	51
Oses (exprimés en glucose).	15	16,5	11,5
Lipides	22	28	15,2
Total (protéines + oses + lipides)	89,5	80	77,7

(*) Le total du poids recouvré des enveloppes + corps cellulaires représente 87 pour 100 du poids initial des sphéroïdes ; la perte de poids (13 pour 100) se produit pendant la dialyse.

En lavant les tréponèmes une fois en eau physiologique puis en les traitant par l'eau saturée de butanol, sans les soumettre à une vésiculation préalable, on obtient un surnageant de centrifugation qui contient, comme avec la méthode précédente, les trois-quarts environ de l'activité antigénique réagissant avec l'anticorps naturel antipolyoside d'enveloppe ; toute l'activité protéique de groupe demeure dans la fraction insoluble. Si ce surnageant est séparé immédiatement et dialysé séparément du reste des tréponèmes, il ne contient plus d'A.D.N. mais seulement des traces d'A.R.N. Toutefois, en microscopie optique, on voit dans ce cas que la dispersion de l'enveloppe n'est pas totale : 20 à 30 pour 100 des tréponèmes persistent sous la forme de disques plats analogues à ceux que l'on obtient en traitant les formes hélicoïdales par le toluène. La microscopie électronique montre qu'un pourcentage identique de cellules possède encore un reste d'enveloppe. Le lavage des corps cellulaires pour éliminer les restes de l'enveloppe solubilise progressivement leur activité antigénique protéique de groupe ; ceci indique que les corps cellulaires ne peuvent être purifiés par cette technique.

Cette seconde méthode est donc tout aussi efficace que la première pour solubiliser l'antigène fixant le complément avec l'anticorps naturel antipolyoside de l'enveloppe ; elle est cependant moins efficace pour solubiliser la totalité des enveloppes si l'on veut respecter les constituants du cytoplasme.

Il était néanmoins intéressant de comparer les résultats de l'analyse chimique des fractions cellulaires obtenues par cette méthode (tableau X) aux résultats obtenus précédemment.

TABLEAU X.

Analyse, exprimée en pourcentage, des principaux constituants de l'enveloppe extraits par action directe de l'eau saturée de butanol sur les formes hélicoïdales lavées une fois.

Préparations de *T. reiteri*	Cellules entières (formes hélicoïdales lavées)	Enveloppes	Corps cellulaires (+ restes d'enveloppes)
Poids sec relatif (%)	100	22 (*)	72 (*)
Constituants (%):			
N	10	5,8	11,5
P	1,8	2	1,8
Protéines	51	28	59
Oses (exprimés en glucose).	15,5	24	12
Lipides	22	40	17
Total (protéines + oses + lipides)	88,5	92	88

(*) Le total du poids recouvré des enveloppes + corps cellulaires représente 94 pour 100 du poids initial des cellules ; la perte de poids (6 pour 100) se produit pendant la dialyse.

Ici, l'enveloppe représente un pourcentage pondéral légèrement plus faible que celui obtenu avec la méthode précédente. Les résultats ont la même signification mais, cette fois, la richesse de l'enveloppe en oses et en lipides apparaît plus nettement.

L'analyse chromatographique (*) des lipides phosphorés montre que les préparations d'enveloppe et les corps cellulaires renferment les mêmes mélanges de lipides. Ce fait est surprenant ; on peut se demander si les phosphatides présents dans les préparations d'enveloppe ne proviendraient pas de l'extraction des phosphatides cytoplasmiques par l'eau saturée de butanol. Afin de vérifier cette éventualité nous avons comparé le pouvoir de ce solvant à extraire les lipides d'un bacille à Gram positif (*B. megaterium*) et d'un bacille à Gram négatif (*E. coli*), dans des conditions identiques à celles utilisées pour la solubilisation de l'enveloppe de *T. reiteri*. On sait que les bactéries à Gram positif ne possèdent pas de lipides dans leur paroi, contrairement aux bactéries à Gram négatif (Salton, 1964).

(*) Nous remercions J. Marechal d'avoir eu la gentillesse d'effectuer cette analyse.

Les quantités de lipides extraits de ces deux bactéries et de *T. reiteri*, exprimées en pourcentage du poids sec de chacun des microorganismes, sont rapportées dans le tableau XI.

TABLEAU XI.

Pourvoir de l'eau saturée de butanol à extraire les lipides par traitement direct des microorganismes.

	B.megaterium	*E. coli*	*T.reiteri*
Lipides totaux	NE	13	22
Lipides extraits par action directe de l'eau saturée de butanol	0,4	2,4	9

Les chiffres représentent les pourcentages de poids sec. NE : non effectué.

La faible proportion de lipides extraits du tréponème laisse penser que l'eau saturée de butanol, agissant sur des cellules intactes, ne dissout que les lipides directement accessibles du revêtement cellulaire externe.

La teneur élevée des tréponèmes en lipides, comparativement à celle des eubactéries, semble liée pour une grande part à une particulière richesse de leur enveloppe en lipides.

En conclusion, la constitution chimique de l'enveloppe du tréponème est complexe (lipides, oses, protéines). Cette complexité la distingue nettement de la capsule des eubactéries, constituée presque exclusivement soit de polyosides, soit de polypeptides ; elle rapproche l'enveloppe de la paroi des eubactéries à Gram négatif.

C) Analyse immunologique de l'enveloppe et du corps cellulaire.

Cette étude a comporté :

— l'analyse par immunoprécipitation en gel et par fixation du complément de l'enveloppe et du corps cellulaire, comparativement au tréponème entier. L'enveloppe a été extraite par action directe de l'eau saturée de butanol, sans vésiculation préalable. Les trois préparations ont été traitées par les ultrasons, ce traitement n'étant toutefois pas indispensable pour l'enveloppe qui contient déjà les antigènes sous une forme soluble. Cette analyse a été faite avec un sérum de lapin anti-*T. reiteri.*

— l'immunisation de lapins par l'enveloppe, le corps cellulaire et le tréponème entier. On injecte des poids d'enveloppe ou de corps tréponémique proportionnel à la quantité de chaque fraction cellulaire présente dans le tréponème entier. L'immunisation a été effectuée en présence de 1 pour 100 d'alun de potassium ; cet adjuvant nous permet d'obtenir des sérums révélant un plus grand nombre d'antigènes en milieu gélifié. Malgré cette précaution, la capacité des animaux à s'immuniser vis-à-vis de certains antigènes varie beaucoup d'un individu à l'autre.

1) Dénombrement des antigènes.

L'analyse en milieu gélifié de l'enveloppe, du corps cellulaire et du tréponème entier, donne les résultats schématisés dans la figure 43. Ce schéma regroupe les résultats obtenus avec les meilleurs immunsérums antitréponèmes vis-à-vis des trois préparations antigéniques.

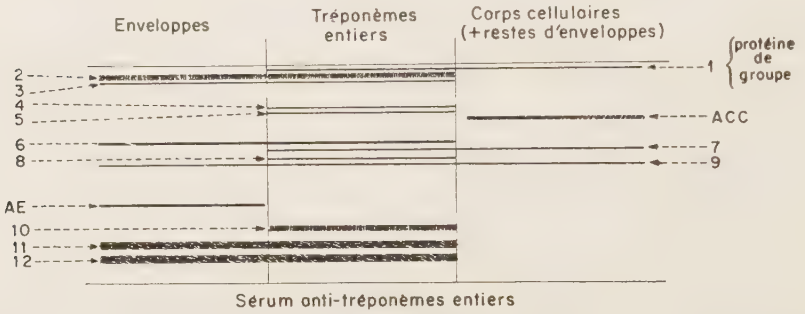


Fig. 43. — Distribution des raies de précipitation obtenues par l'analyse en milieu gélifié en comparant les préparations de l'enveloppe, du tréponème entier et du corps cellulaire. Les douze antigènes révélés dans les tréponèmes entiers sont numérotés de 1 à 12.
A.E. représente un antigène qui ne se révèle que dans l'enveloppe et A.C.C. un antigène qui ne se révèle que dans le corps cellulaire.

On constate que :

1°. le nombre d'antigènes révélés dans la cellule entière est supérieur au nombre mentionné pour *T. reiteri* dans l'étude de la constitution antigénique des spirochètes (chapitre III). Cette augmentation, de sept à douze, tient à l'utilisation de l'adjuvant et au choix des meilleurs immunsérums.

2°. Six des antigènes décelés dans la cellule entière sont retrouvés dans l'enveloppe. Le corps cellulaire ne possède que trois des antigènes de la cellule entière dont l'un est commun à l'enveloppe et au corps cellulaire.

3°. Deux antigènes non révélés dans la cellule entière apparaissent dans les produits du fractionnement, l'un dans l'enveloppe, l'autre dans le corps cellulaire. Il ne peut s'agir que d'antigènes qui ne diffusent pas à partir du tréponème entier mais qui deviennent diffusibles après le traitement par l'eau saturée de butanol.

4°. Quatre antigènes de la cellule entière ne sont plus retrouvés ; nous verrons ci-dessous que certains de ces antigènes ont perdu leur réactivité *in vitro* et non leur pouvoir immunogène.

La majorité des antigènes décelables dans les tréponèmes appartient donc à l'enveloppe.

Cette analyse en milieu gélifié du tréponème et de ses deux fractions ne fait mention que des antigènes les plus fréquemment mis en évidence. Nous constatons en effet des variations du nombre de raies

d'une préparation de tréponèmes à une autre, ce qui est vraisemblablement dû à des variations de la diffusibilité de certains antigènes.

L'immunisation des lapins par l'enveloppe fait apparaître des anticorps précipitants avec tous les antigènes individualisés dans cette préparation, mais aussi avec plusieurs antigènes décelés seulement dans la cellule entière. Le corps cellulaire est immunogène pour tous ses antigènes révélés *in vitro*, mais aussi pour deux antigènes de l'enveloppe. Ce fait est sans doute dû à la séparation incomplète des enveloppes dans nos conditions d'extraction, faite sans vésiculation préalable des tréponèmes.

En fixation du complément, les sérums anti-enveloppe et anti-corps cellulaire réagissent avec la préparation antigénique homologue mais également avec la préparation hétérologue. Ces réactions croisées semblent consécutives au fait que le corps cellulaire est encore contaminé par des quantités d'antigènes d'enveloppe qui sont trop faibles pour se révéler en immunoprécipitation mais suffisantes pour le faire en fixation du complément, car cette dernière réaction est au moins vingt fois plus sensible que la première (Kabat et Mayer, 1961).

2) Nature des antigènes de l'enveloppe et du corps cellulaire.

Le traitement de l'enveloppe par la papaïne et la chaleur (120°C), dénaturant pour l'antigène protéique de groupe (Pillot et Dupouey, 1964), ne fait disparaître qu'un seul des sept antigènes précipitants de l'enveloppe ; la préparation conserve son pouvoir de fixer le complé-

TABLEAU XII.

Fixation du complément. Activité antigénique de l'enveloppe et du corps cellulaire avant et après dénaturation des protéines.

		Sérum *anti-T. reiteri*		Sérum *anti-T. pallidum* (antiprotéine de groupe)	
		1/100	1/400	1/4	1/16
Enveloppes (5 mg/ml)	1/50	++++	—	—	—
	1/150	++++	+	—	—
	1/450	++++	—	—	—
Enveloppes papaïnées puis chauffées à 120°C	1/50	++++	—	—	—
	1/150	++++	—	—	—
	1/450	+++	—	—	—
Corps cellulaires (14 mg/ml)	1/50	++++	+++	++++	+
	1/150	++++	+++	++++	+++
	1/450	+++	—	+	—
Corps cellulaires papaïnés puis chauffés à 120°C	1/50	—	—	—	—
	1/150	—	—	—	—
	1/450	—	—	—	—

ment. Par contre, le même traitement fait disparaître les trois antigènes précipitants présents dans le corps cellulaire ; la préparation ne fixe plus le complément (tableau XII). En d'autres termes, les antigènes polyosidiques prédominent dans l'enveloppe et les antigènes protéiques prédominent dans le corps cellulaire.

Parmi les antigènes protéiques, la protéine de groupe se retrouve chez tous les représentants du genre *Treponema*. Chez les bactéries d'une même famille ou d'un même genre, Barbu (1961) a noté l'existence d'une communauté antigénique au niveau des protéines des ribosomes ; ceci nous conduit à supposer que la protéine de groupe, difficile à solubiliser (Pillot et Faure, 1959), pourrait être la protéine de structure des ribosomes. Nous constatons en effet que la protéine de groupe sédimente avec la même constante que les ribosomes (70 S) ; toutefois, la préparation obtenue n'est pas assez pure pour que la nature ribosomale de cette protéine puisse être actuellement établie d'une manière certaine.

La délipidation de l'enveloppe, effectuée à basse température pour ne pas dénaturer les activités antigéniques, augmente la diffusibilité des antigènes qu'elle contient et permet de révéler un antigène supplémentaire dans la préparation. L'activité en fixation du complément de l'enveloppe n'est que peu affectée par cette délipidation ; on note seulement une diminution de la sensibilité de la réaction avec les plus grandes dilutions de l'immunsérum. Les lipides de l'enveloppe ne semblent donc pas posséder d'activité immunologique spécifique ; ils paraîssent plutôt intervenir dans la liaison des différents sites antigéniques portés par les polyosides et dans leur activation immunologique.

L'analyse immunologique de l'enveloppe du corps cellulaire de *T. reiteri* conduit aux conclusions suivantes.

1° L'enveloppe possède la plus grande partie des antigènes décelables dans le tréponème.

2° L'enveloppe est constituée surtout d'antigènes polyosidiques liés à des lipides. Dans ces complexes lipidiques et polyosidiques la spécificité immunologique est portée par la fraction polyosidique.

3° La plupart des antigènes protéiques sont localisés dans le corps cellulaire.

DISCUSSION.

L'analyse des structures anatomique et antigénique des tréponèmes nous conduit à discuter successivement cinq problèmes :

1° la situation des *Spirochaetales* au sein des protistes,

2° la détermination des caractères propres aux *Spirochaetales*,

3° le choix des éléments permettant la discrimination des genres chez les *Spirochaetales*,

4° le choix des éléments permettant la discrimination des espèces chez les tréponèmes,

5° les modifications qu'il nous semble souhaitable d'apporter à la classification actuellement admise des *Spirochaetales*.

I. La situation des *Spirochaetales* au sein des protistes. Les *Spirochaetales* sont des procaryotes.

La distinction entre les procaryotes et les eucaryotes est fondée actuellement sur les caractères mentionnés dans le tableau XIII ; nous y joignons les caractères des *Spirochaetales*.

TABLEAU XIII.

Caractères fondamentaux permettant la distinction des procaryotes et des eucaryotes. Caractères des Spirochaetales.

	Procaryotes (Schizomycètes, cyanophycées)	Eucaryotes	*Spirochaetales*
Noyau	matériel nucléaire non limité par une membrane, chromosome unique	noyau limité par une membrane, plusieurs chromosomes	matériel nucléaire non limité par une membrane
Réticulum endoplasmique	non individualisé	habituellement présent	non individualisé
Synergon de la respiration	pas de mitochondries intracytoplasmiques, mésosomes	mitochondries intracytoplasmiques	mésosomes
Elément de l'organe locomoteur	pas de sous-unités	sous-unités (9 + 2)	pas de sous-unités
Particularités chimiques	glycosaminopeptide, pas de stérols	pas de glycosaminopeptide, stérols	glycosaminopeptide

Tous les caractères que nous avons recherchés chez les *Spirochaetales* conduisent à les considérer comme des procaryotes.

— Le matériel nucléaire n'est pas inclus dans une membrane.

— *Les Spirochaetales* possèdent les mésosomes qui remplissent chez les bactéries les fonctions biochimiques normalement dévolues aux mitochondries. Toutefois, les cristispires possèdent un système de vésicules intracytoplasmiques à double membrane dont on ne connait pas l'équivalent chez les protistes.

— L'élément fondamental de l'appareil locomoteur (fibrille ou axostyle) ne se décompose pas en sous-unités alors que le flagelle des eucaryotes se résoud en onze éléments (9 + 2). La structure des fibrilles chez les tréponèmes est comparable à celle observée par Williams et Chapman (1961) chez les spirilles ; du même point de vue, l'axostyle des leptospires est comparable au flagelle unique des vibrions tel que l'ont décrit Glauert, Kerridge et Horne (1963).

— Les tréponèmes, borrelia et leptospires (Ginger, 1963), contiennent le glycosaminopeptide qui assure la rigidité de la paroi des bactéries et qui n'est présent que chez les procaryotes.

II. — Détermination des caractères propres aux *Spirochaetales*.

Les *Spirochaetales* se différencient des bactéries surtout par la situation interne de leur appareil locomoteur. Leur structure est voisine de celle des bactéries à Gram négatif.

Nous retrouvons chez toutes les *Spirochaetales* une même structure schématisée dans la figure 44.

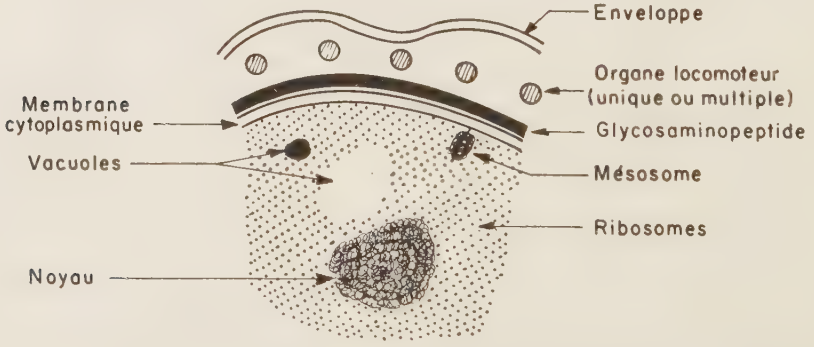


Fig. 44. — Structure schématisée d'une coupe transversale d'une *Spirochaetale*.

Les *Spirochaetales* sont constituées par :

— une enveloppe externe, souple, élastique et fragile,

— un corps cellulaire de disposition hélicoïdale, constitué d'un cytoplasme et contenant les vacuoles et le noyau,

— une membrane limitant le corps cellulaire et possédant à la fois les caractères d'une paroi (glycosaminopeptide) et d'une membrane cytoplasmique (mésosomes) de bactérie, et que de ce fait nous dénommons membrane pariéto-cytoplasmique,

— un organe locomoteur interne situé dans l'espace limité extérieurement par l'enveloppe et intérieurement par la membrane pariéto-cytoplasmique.

L'analyse des fractions cellulaires de tréponème et la confrontation de nos résultats avec ceux obtenus par d'autres auteurs chez les bactéries, révèlent des analogies dans la composition des différents plans architecturaux de la cellule entre les tréponèmes et les eubactéries à Gram négatif.

A) L'enveloppe.

1° Elle est *différente* de la capsule des eubactéries dont les caractères ont été récemment revus par Salton (1964).

— L'enveloppe est souple, élastique et nettement délimitée, tandis que la capsule est dénuée de plasticité et souvent mal délimitée.

Bien que nous ne connaissions pas son rôle métabolique, nous sommes enclin à considérer l'enveloppe comme vitale ; sa perforation au micromanipulateur immobilise instantanément le tréponème ; le tréponème dépouillé de son enveloppe meurt rapidement tandis que la digestion de la capsule n'est pas léthale chez les eubactéries.

— La complexité de la composition chimique de l'enveloppe (lipides, oses, protéines) la différencie de la capsule bactérienne qui est constituée presque exclusivement soit de polyosides, soit de polypeptides.

2° L'enveloppe est anatomiquement *différente des revêtements* qui enserrent les cellules de cyanophycées (Frank, Lefort et Martin, 1962), de *Lampropedia hyalina* (Chapman, Murray et Salton, 1963) et de *Sphaerotilus natans* (Romano et Peloquin, 1963). D'autre part la rigidité de ces revêtements s'oppose à la souplesse de l'enveloppe.

3° L'enveloppe présente au microscope électronique une structure analogue à celle de la paroi des eubactéries à Gram négatif (pour les caractères de cette dernière voir Salton, 1964).

L'une et l'autre sont constituées de trois feuillets, le feuillet médian étant moins dense aux électrons que les feuillets externe et interne. D'ailleurs, lorsque les dimensions des *Spirochaetales* permettent leur examen en microscopie optique ordinaire après coloration, celles-ci sont toujours Gram négatif.

Cependant enveloppe et paroi ont des propriétés différentes : l'enveloppe est douée d'une grande plasticité alors que la paroi est rigide. Chez les bactéries, la rigidité de la paroi est assurée par le glycosaminopeptide qui est absent de l'enveloppe des tréponèmes. La microscopie électronique classique ne révèle pas cette différence entre la paroi et l'enveloppe car elle ne permet pas de déceler le glycosaminopeptide. Murray (1965) et de Petris (1965) ont montré récemment que ce composé ne devient visible qu'après un traitement des coupes par le ni-

trate de lanthane ou l'acétate d'uranyle. Par ce procédé, ces auteurs ont mis en évidence chez les bactéries à Gram négatif l'existence d'un feuillet situé entre la membrane cytoplasmique et la paroi. Ce feuillet, invisible sur les coupes effectuées par les procédés classiques, contient le glycosaminopeptide. En effet, chez les sphéroplastes obtenus en présence de pénicilline ou sous l'action du lysozyme et du versène, traitements qui détruisent électivement le glycosaminopeptide, ce feuillet est altéré ou a disparu.

Chez les sphéroplastes de vibrions induits par la pénicilline, Salton et Shafa (1958) ont noté l'existence d'un grand interstice entre la paroi telle qu'elle apparaît au microscope électronique et la membrane cytoplasmique. On peut maintenant penser que, dans ce cas, la dilatation de la membrane cytoplasmique maintenue par un feuillet glycosaminopeptidique de moins en moins résistant, progresserait plus lentement que la dilatation de la paroi visible.

D'autre part, il ressort des travaux de Murray (1965) que, chez *E. coli*, le feuillet dense interne de la paroi, telle qu'elle apparaît classiquement au microscope électronique, adhère étroitement au feuillet sous-jacent constitué par le glycosaminopeptide. Par contre, chez les *Moraxella*, les *Vitreoscilla* et les spirilles, la paroi classiquement visibles se dissocie du feuillet rigide ; chez ces bactéries, elle fait donc preuve d'une moins grande adhérence au feuillet glycosaminopeptidique que chez *E. coli* (fig. 45).

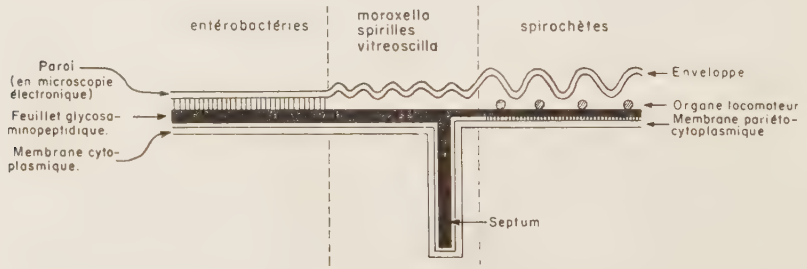


Fig. 45. — Diagramme représentant les analogies entre les différents revêtements cellulaires de bactéries à Gram négatif et de *Spirochaetales*.

On peut donc maintenant affirmer que la paroi des bactéries à Gram négatif, dans le sens physiologique du terme, est constituée d'une part de trois feuillets externes relativement souples, visibles en microscopie électronique classique, d'autre part d'un feuillet interne, rigide, adhérent ou non aux précédents, visible seulement après imprégnation par certains métaux.

Dans ces conditions, on peut assimiler l'enveloppe des *Spirochaetales* aux trois feuillets les plus externes de la paroi des eubactéries à Gram négatif : l'enveloppe des *Spirochaetales* correspond à la partie la plus souple de la paroi et chez les *Spirochaetales* la laxité de ces trois feuillets est très grande.

En effet, la composition chimique de l'enveloppe des *Spirochaetales* est analogue à celle de la paroi des eubactéries à Gram négatif ; l'une et l'autre sont constituées de lipides, d'oses et de protéines. Cette complexité de la paroi des eubactéries à Gram négatif et de l'enveloppe des *Spirochaetales* la distingue bien de la paroi des eubactéries à Gram positif qui ne contient ni protéines, ni lipides (tableau XIV).

TABLEAU XIV.

Structure de la paroi d'un bacille à Gram positif, d'un bacille à Gram négatif, et de l'enveloppe des Spirochaetales.

	Paroi de *B. megaterium*	Paroi de *E. coli*	Enveloppe de *T. reiteri*
Nombre de feuillets	1	3	3
Epaisseur en Å	200-250	90-100	100-120
Contribution au poids de la cellule %	20-25	15	25
Lipides %	0	20	40
Oses réducteurs %	19	16	24
Protéines %	0	présence de protéines, pas de dosage connu	28
N %	5,3	10	5,8
P %	0,42	1,5	2
Situation du glycosaminopeptide	partie intégrante du feuillet	sous-jacent au feuillet interne	sus-jacent à la membrane cytoplasmique
Sensibilité aux tensio-actifs et à l'eau saturée de butanol	0	0	+
Spécificité antigénique liée aux:		polyosides	polyosides

Les données relatives à *B. megaterium* et à *E. coli* sont en grande partie extraites de l'ouvrage de Salton (1964).

Comme la paroi des eubactéries à Gram négatif, l'enveloppe du tréponème est riche en polyosides liés à des lipides ; dans l'enveloppe comme dans la paroi ce sont les polyosides qui portent la plus grande partie de l'activité immunologique. La spécificité immunologique des polyosides de l'enveloppe est analogue à celle des polyosides de la paroi des entérobactéries puisque la réaction d'agglutination des tréponèmes est spécifique de la souche qui a servi à l'immunisation. Cette spécificité immunologique de l'enveloppe explique sans doute comment les leptospires, comme les salmonelles, sont divisées en sérotypes par l'agglutination.

Les trois feuillets externes de la paroi des eubactéries à Gram négatif se distinguent toutefois de l'enveloppe des tréponèmes. Cette dernière, à l'inverse de la paroi, est sensible aux agents tensio-actifs et à l'eau saturée de butanol. Cette différence tient peut-être à la plus grande richesse en lipides de l'enveloppe. Il est possible également que les trois feuillets externes de la paroi soient plus stables grâce à l'assise glycosaminopeptidique à laquelle ils sont plus ou moins liés.

B) La membrane pariéto-cytoplasmique.

1° La membrane limitant le cytoplasme est pariétale dans le sens physique et chimique du terme puisque nous retrouvons le glycosaminopeptide qui confère aux parois leur résistance, constamment associé au corps cellulaire. La présence du glycosaminopeptide a été signalé par Ginger (1963) chez *B. duttonii* et *L. ictero-hemorrhagiae* ; cet auteur trouve chez *B. duttonii* un taux de glucosamine et d'acide muramique voisin de celui des eubactéries à Gram négatif (0,38 %). Chez *T. reiteri* ce taux est deux fois plus faible (0,20 %) (Ginger, 1964).

La croissance des tréponèmes en présence de pénicilline confirme la présence du glycosaminopeptide en montrant que la défaillance mécanique se situe au niveau de la membrane cytoplasmique ; celle-ci en effet se dilate en repoussant l'enveloppe. L'aspect est bien différent de celui de la vésiculation au cours de laquelle l'enveloppe se sépare d'un corps cellulaire qui maintient son volume initial. L'image de la coupe du tréponème au niveau de la lésion que provoque la pénicilline, est superposable à celle des sphéroplastes ; le cytoplasme dans les deux cas est limité par deux séries de membranes à triple feuillet.

Cette position du glycosaminopeptide au contact de la membrane cytoplasmique n'est pas particulière aux *Spirochaetales* ; en effet, Frank, Lefort et Martin (1962) trouvent une situation analogue chez les cyanophycées.

Nos essais de coloration d'un feuillet glycosaminopeptidique chez *T. reiteri* n'ont donné aucun résultat ; nous pensons que cet échec résulte de sa faible teneur en glycosaminopeptide.

Le glycosaminopeptide assure au corps cellulaire sa forme cylindrique et sa disposition hélicoïdale sans lui conférer une rigidité absolue. Depuis Bradfield et Cater (1952), il est classique d'admettre que la morphologie hélicoïdale est due à une rétraction de la cellule selon son axe longitudinal, sous l'effet d'une tension de l'organe locomoteur inséré aux deux extrémités. Cette conception est erronée car dépouillés de leur enveloppe et de leurs fibrilles (l'eau saturée de butanol les libère de leur insertion), les tréponèmes conservent grossièrement leur morphologie hélicoïdale.

Dans le corps cellulaire comme après extraction, le glycosaminopeptide de *T. reiteri* est insensible au lysozyme, même en présence de versène. Cette insensibilité de certains glycosaminopeptides au lysozyme est bien connue ; on sait qu'elle est due notamment à un type de liaison autre que β (1-4) entre l'acide N-acétyl muramique et la N-acétyl-glucosamine, ou bien à l'acétylation des fonctions hydroxyles de l'acide (Salton, 1964).

2° La membrane est cytoplasmique par sa position limitante du cytoplasme, au sein duquel elle constitue les mésosomes par ses nombreux replis.

La membrane pariéto-cytoplasmique des tréponèmes présente un caractère qui la distingue de la membrane cytoplasmique de *B. megaterium* et d'*E. coli* : elle est insensible aux tensio-actifs et à l'eau saturée de butanol. Il est possible que cette stabilité lui soit conférée par le feuillet glycosaminopeptidique.

C) L'appareil locomoteur.

Sa localisation entre l'enveloppe et la membrane pariéto-cytoplasmique est très caractéristique des *Spirochaetales* : on ne connaît pas d'autre exemple d'organe locomoteur interne chez les protistes inférieurs. Il est logique d'ailleurs, pour des raisons de dynamique, que l'organe locomoteur soit extérieur au feuillet le plus résistant du spirochète ; ceci est donc compatible avec sa situation sous l'enveloppe puisque cette dernière ne contient pas le glycosaminopeptide.

L'organe locomoteur s'insère aux deux extrémités de la cellule par l'intermédiaire de granules analogues à ceux que l'on décrit à la base des flagelles bactériens.

Cependant nos connaissances relatives à cet appareil locomoteur sont incomplètes et plusieurs problèmes ne sont pas résolus.

1° Y-a-t-il continuité de la fibrille ou de l'axostyle d'une extrémité à l'autre du corps cellulaire avec insertion à chaque extrémité ? (fig. 46, I).

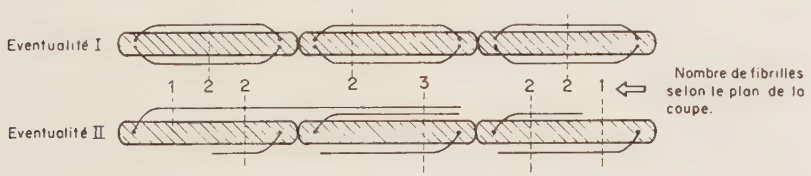


Fig. 46. — Représentation schématique des deux éventualités relatives à l'insertion d'un organe locomoteur de tréponème constitué théoriquement de deux fibrilles. La partie hachurée représente le corps cellulaire du tréponème.

Dans l'affirmative, la duplication de l'appareil locomoteur est difficilement concevable pour des microorganismes comme les *Spirochaetales* qui se divisent selon le mode transversal. Le plus simple serait de supposer qu'au moment de la division cellulaire une coupure du faisceau de fibrilles se produit dans sa partie médiane suivie d'une insertion des fibrilles au niveau des nouvelles extrémités. L'hypothèse d'une dégénérescence du faisceau suivie de la formation de deux nouveaux faisceaux est difficile à admettre.

2°) L'organe locomoteur n'est-il inséré qu'à une extrémité ?

Listgarten et Socransky (1964) ont présenté des clichés de *T. microdentium* qui seraient en faveur de cette éventualité. Des fibrilles émanant de pôles opposés pourraient se côtoyer parallèlement

(fig. 46, II). Cette conception expliquerait les variations du nombre des fibrilles que l'on observe dans une même cellule et d'un individu à l'autre au sein d'une même espèce. L'organe locomoteur des tréponèmes et des borrelia s'apparenterait ainsi davantage au bouquet des flagelles (eux-mêmes hélicoïdaux) situé à chaque pôle de la cellule des spirilles. L'organe locomoteur unique des leptospires s'apparenterait, de son côté, au flagelle polaire unique des vibrions. D'après ces analogies, on pourrait penser que des bouquets de flagelles ou un axostyle apparaîssent au moment de la division cellulaire au voisinage du plan de clivage de la cellule, comme cela a été décrit chez les vibrions (Pease, 1956).

Nous n'avons jamais observé d'images nous permettant d'envisager un tel mécanisme chez les *Spirochaetales*. Sur nos clichés, nous observons si fréquemment une issue de l'organe locomoteur hors de l'enveloppe, qu'il est difficile d'affirmer que, chez les *Spirochaetales* non altérées, les fibrilles possèdent une extrémité libre.

III. Le choix des caractères permettant la discrimination des genres.

Les genres *Spirochaetales* se distinguent entre eux par leurs structures anatomique et antigénique.

A) Distinction anatomique.

Les caractéristiques anatomiques de chacun des genres sont récapitulées dans le tableau XV.

La qualité de l'enveloppe est appréciée en fonction de son aptitude à donner des formes hélicoïdales vésiculées ou des sphéroïdes dans des conditions naturelles ou artificielles (chapitre IV). La résistance à la lyse du corps cellulaire reflète la qualité physique de la membrane pariéto-cytoplasmique. Chez les cristispires et les leptospires, l'association des résistances propres à l'enveloppe et à la membrane pariéto-cytoplasmique semble nécessaire pour équilibrer la pression osmotique du cytoplasme car, dès que l'enveloppe est altérée, le corps cellulaire se lyse.

La distinction anatomique des différents genres ne soulève aucun problème, si ce n'est la distinction difficile entre les genres *Treponema* et *Borrelia*.

B) Distinction antigénique.

Cette distinction n'est valable qu'à la condition d'inclure dans la gamme des réactions l'immunofluorescence qui s'avère la méthode susceptible de déceler les plus faibles quantités d'antigènes, quelle que soit leur situation externe ou interne dans la cellule (tableau XVI). Il n'y a aucune réaction croisée entre les représentants des différents genres, sauf entre ceux des genres *Treponema* et *Borrelia*,

TABLEAU XV.

Principales caractéristiques anatomiques des différents genres de Spirochaetales.

Genre :	*Treponema*	*Borrelia*	*Cristispira*	*Leptospira*
Diamètre cellulaire (μ)	0,11-0,25	0,34	2-3	0,1
Appareil locomoteur :				
nombre d'éléments	3 à 7	15 à 20	plusieurs centaines	1
disposition	hélicoïdale	hélicoïdale	hélicoïdale	rectiligne ou curviligne
Aspect de l'enveloppe après traitement par La $(NO_3)_2$	3 feuillets	3 feuillets	3 feuillets	4 feuillets
Résistance de l'enveloppe.....	plutôt faible	faible	extrêmement faible	extrêmement faible
Résistance de la membrane pariéto-cytoplasmique	bonne	notable	extrêmement faible	faible
Vésicules intra-cytoplasmiques.	—	—	+	—
Noyau	dispersé	dispersé	dispersé	compact

TABLEAU XVI.

Valeur taxonomique comparative des différentes réactions immunologiques pour la distinction des genres chez les Spirochaetales, *et des espèces chez les tréponèmes.*

	Agglutination	Fixation du complément	Immuno fluorescence	Immuno précipitation
Distinction des genres de *Spirochaetales*	0	++	++++	+++
Distinction des espèces de tréponèmes	++++	++	0	+++

La valeur des réactions est chiffrée arbitrairement de + à ++++.

IV. Le choix des éléments permettant la discrimination des espèces.

La distinction des espèces du genre Treponema ne peut être qu'immunologique.

L'anatomie ne permet pas la résolution de nouveaux groupes taxonomiques au-dessous du genre.

Chez *T. pallidum*, on peut néanmoins signaler l'existence d'une enveloppe nettement plus résistante que chez les autres tréponèmes : les boursouflures de l'enveloppe y sont plus rares et moins accentuées, l'interstice enveloppe - membrane pariéto - cytoplasmique disparaît presque complètement comme si le feuillet interne de l'enveloppe était plus solidement appliqué sur la membrane ; la vésiculation artificielle est plus difficilement obtenue. Au cours de l'infection syphilitique, l'aptitude très particulière de *T. pallidum* à se soustraire aux défenses de l'hôte est peut-être en relation avec la qualité particulière de cette enveloppe.

Par contre, l'immunologie reconnaît les espèces de tréponèmes, bien que toutes les réactions immunologiques ne soient pas aptes à effectuer cette discrimination (tableau XVI). L'immunoprécipitation montre que la plupart des systèmes antigéniques précipitants révélés entre une espèce de tréponème et l'immunsérum homologue, sont propres à cette espèce. L'agglutination par des immunsérums suffisamment dilués est également très spécifique de l'espèce.

L'agglutination semble d'ailleurs la méthode de choix car elle révèle seulement les antigènes de l'enveloppe et ceux-ci sont les plus spécifiques de tous les antigènes contenus dans la cellule. Les antigènes profonds, notamment cytoplasmiques, ont une spécificité immunologique moins étroite puisqu'elle s'étend au moins à l'ensemble du genre *Treponema*. Nous pensons que ces antigènes profonds, même s'ils sont accessibles après altération de l'enveloppe, ne sont jamais

révélés par l'agglutination parce qu'ils sont situés à une profondeur supérieure à la moitié de la longueur de la molécule d'immunoglobuline ; dans ces conditions, deux cellules ne peuvent être réunies par l'intermédiaire des molécules d'immunoglobulines.

La fixation du complément et surtout l'immunofluorescence donnent peu ou pas de renseignements pour la distinction des espèces. Ces réactions révèlent, en effet, aussi bien les antigènes de surface les plus spécifiques des différents tréponèmes que les antigènes situés en profondeur, les moins spécifiques. La pénétration des anticorps, dans le cas de l'immunofluorescence, est largement facilitée par la fixation préalable des cellules sur la lame, ce qui provoque des altérations.

Les données rapportées dans la littérature montrent que la distinction antigénique de certaines espèces de tréponèmes soulève des difficultés analogues à celles que nous avons mentionnées pour la distinction anatomique des genre *Borrelia* et *Treponema*. Par l'immunoprécipitation, Dupouey (1962) trouve sept à huit antigènes chez *T. reiteri*, dont cinq à six sont communs avec *T. phagedenis*. Nous retrouvons des différences analogues entre la souche de *T. reiteri* dont nous disposons et la souche de même nom cultivée actuellement aux Etats-Unis. Ces petites différences ne justifient pas, à notre avis, l'existence d'espèces distinctes. Il n'en demeure pas moins vrai que le minimum de différences à partir duquel on peut individualiser une espèce nouvelle, dans le domaine des tréponèmes comme ailleurs, restera dépendant de « l'idiosyncrasie de chacun » (Lwoff, 1958).

V. La classification actuellement admise des *Spirochaetales*. Modifications proposées.

A. — Puisque les *Spirochaetales* sont des procaryotes typiques, la place que leur assignent Breed, Murray et Smith (1957) dans la classe des *Schizomycetes* est pleinement justifiée. Les *Spirochaetales* ne doivent donc pas être placées dans le « sous-règne » des *Protozoaires* comme le préconise van Thiel (1958), ni dans le « sous-embranchement » des *Protozoobacteria* comme le préconise Prevot (1957).

B. — Il est classique de subdiviser les procaryotes en fonction de la nature de leur paroi et du mécanisme de leur mouvement (Stanier, Doudoroff et Adelberg, 1963). Or les *Spirochaetales*, qui s'apparentent aux eubactéries à Gram négatif par leur enveloppe, se distinguent par contre très nettement des autres procaryotes par la situation interne de leur appareil locomoteur ; leur groupement dans une catégorie propre, de même valeur taxonomique que les eubactéries et les bactéries se déplaçant par glissement, tel l'ordre des *Spirochaetales* Buchanan, 1918, est donc toujours acceptable. Les *Spirochaetales* sont définies par Breed, Murray et Smith (1957) comme des cellules « hélicoïdales, flexibles et mobiles, mais dont la mobilité n'est pas assurée par des flagelles semblables à ceux des eubactéries ». D'après nos résultats, il devient possible de préciser cette définitition des *Spirochaetales* : les *Spirochaetales* sont des bactéries « hélicoïdales,

flexibles et mobiles grâce à un appareil locomoteur interne situé entre une enveloppe externe souple et une membrane pariéto-cytoplasmique plus rigide ».

C. — D'après la morphologie observée au microscope optique, la majorité des taxonomistes, avec Breed, Murray et Smith (1957), divisent les *Spirochaetales* en deux familles : les *Spirochaetaceae* et les *Treponemataceae*.

1) Les *Spirochaetaceae* Swellengrebel, 1907, (genre-type : *Spirochaeta* Ehrenberg, 1838) sont définies par leur longueur (30 à 50 μ) et la présence de structures visibles dans la cellule (filament axial, striation transversale...).

Cette famille comprend trois genres.

a) Le genre *Spirochaeta* Ehrenberg, 1838. L'espèce-type, *Spirochaeta plicatilis*, correspond à la première *Spirochaetale* décrite par Ehrenberg. Les cellules de cette espèce présentent un filament axial, mais ne présentent pas de striation après coloration.

b) Le genre *Saprospira* Gross, 1911. Les cellules de ce genre possèdent une striation. On ne les trouve que dans les boues marines.

c) Le genre *Cristispira* Gross, 1910. Les cellules sont striées et présentent une « crête » que les premiers auteurs avaient décrite comme une « membrane ondulante » (Certes, 1882). Ces microorganismes ne sont retrouvés que chez les mollusques.

2) Les *Treponemataceae* Robinson, 1948, (genre-type : *Treponema* Schaudinn, 1905) sont définies par leurs dimensions plus réduites que celles des *Spirochaetaceae* (4 à 16 μ de longueur) et l'absence de structure cellulaire visible. La différenciation de cette famille en trois genres est fondée surtout sur des aptitudes diverses à se colorer.

a) Les espèces du genre *Borrelia* fixent aisément les colorants d'aniline.

b) Les espèces du genre *Treponema* se colorent difficilement. Elles ne sont visibles qu'après imprégnation argentique ou coloration de Giemsa. Ces espèces sont anaérobies.

c) Les espèces du genre *Leptospira* présentent les mêmes affinités tinctoriales que celle du genre *Treponema*, mais sont aérobies.

D'après notre étude cette division des *Spirochaetales* en deux familles n'est pas justifiée.

1° Les espèces des genres *Treponema*, *Borrelia* et *Cristispira* présentent une structure anatomique analogue et notamment un noyau mal délimité. Le noyau des espèces du genre *Leptospira* est au contraire bien défini.

2° Le degré de perception ou non de détails anatomiques ne peut être considéré comme un critère de famille. Dans le genre *Cristispira*, les dimensions cellulaires sont telles que l'on peut percevoir directement certains détails au microscope optique ; au contraire, dans les espèces des genres *Treponema* et *Borrelia*, ces mêmes détails ne sont

retrouvés qu'au microscope électronique. Ainsi chez les cristispires, la « crête » représente l'organe locomoteur, et la striation correspond à des artefacts dus à des inclusions de grandes dimensions.

3° Si l'on tient compte de la disposition de l'appareil locomoteur, il y a plus d'analogie entre les genres *Treponema, Borrelia* et *Cristispira,* qu'entre l'un de ces genres et le genre *Leptospira.*

Dans le genre *Leptospira,* l'appareil locomoteur est constitué d'un unique élément, rectiligne ou curviligne, l'axostyle ; le corps cellulaire s'enroule en hélice autour de l'axostyle.

Dans les genres *Treponema* et *Borrelia,* l'organe locomoteur est constitué de 3 à 15 fibrilles, peut-être davantage, disposées parallèlement. Le faisceau de fibrilles s'enroule en hélice autour du corps cellulaire. Fibrilles et corps cellulaire tournent avec un même pas de vis mais en sens contraire : si l'enroulement du corps cellulaire est dextre, celui du faisceau de fibrilles est senestre.

Dans le genre *Cristispira,* le nombre de fibrilles atteint plusieurs centaines, mais leur disposition est la même que dans les genres *Treponema* et *Borrelia.*

C'est pourquoi, dans l'état actuel de nos connaissances, nous proposons de grouper les *Spirochaetales* des genres *Treponema, Borrelia* et *Cristispira* dans une famille unique, la famille des *Treponemataceae* Robinson, 1948, avec le genre *Treponema* comme genre-type de cette famille.

Compte tenu de ses particularités anatomiques, le genre *Leptospira* est exclu de cette famille et nous proposons de créer pour lui la famille des *Leptospiraceae, nov. fam.,* avec le genre *Leptospira* comme genre-type de cette famille.

Les microorganismes du genre *Saprospira* que tous les ouvrages de systématique considèrent habituellement comme des *Spirochaetales* pluricellulaires, n'ont pas leur place dans l'ordre des *Spirochaetales.* Les saprospires dont les cellules sont disposées bout à bout selon une hélice, sont des procaryotes à paroi rigide, sans appareil locomoteur interne et se déplaçant par glissement (Lewin, 1962). Ces organismes doivent être classés dans la famille des *Flexibacteriaceae* (Fox et Lewin, 1963), ordre des *Flexibacterales* Soriano, 1945, ou des *Myxobacterales* Jahn, 1915.

Quant au genre *Spirochaeta,* sa validité est très discutable. En effet, peu de souches appartenant à ce genre ont été décrites depuis Ehrenberg ; dans certaines de ces descriptions où le filament axial n'est pas mentionné, les souches décrites correspondent à des espèces du genre *Saprospira* (Lewin, 1962). Il est actuellement impossible de se faire la moindre idée sur la structure des organismes du genre *Spirochaeta.* Le genre *Spirochaeta* lui-même devrait être considéré comme *nomen nudum.* Il s'avère donc difficile de laisser subsister une famille qui repose sur un genre-type aussi mal défini.

Nos conclusions relatives à la classification des *Spirochaetales* sont résumées dans le tableau XVII.

TABLEAU XVII.

Classification des Spirochaetales.

	Classification actuellement admise		Classification proposée	
Famille	*Spirochaetaceae*	*Treponemataceae*	*Treponemataceae*	*Leptospiraceae*
Genres	*Spirochaeta* *Saprospira* *Cristispira*	*Treponema* *Borrelia* *Leptospira*	*Treponema* *Borrelia* *Cristispira*	*Leptospira*

D. — La distinction anatomique et antigénique des genres *Treponema* et *Borrelia* est difficile.

En dehors de l'anatomie et de l'immunologie, quels sont les éléments susceptibles de faciliter la discrimination entre les genre *Treponema* et *Borrelia* ?

Les représentants de ces deux genres sont hétérotrophes ; tous métabolisent le glucose par voie fermentative (Fulton et Smith, 1960 ; Pillot, 1962). Les exigences nutritives n'ont été établies, à ce jour, que pour le seul *T. reiteri* (Steinmann, Oyama et Schulze, 1954). La composition en bases de l'A.D.N. étudiée pour *T. reiteri*, *T. phagedenis* et *T. minutum*, a donné un pourcentage moléculaire de guanine + cytosine de 41 pour 100 (*), mais nos cultures de borrelia n'ont jamais été suffisantes pour permettre un dosage analogue.

Comparativement aux tréponèmes, un diamètre cellulaire légèrement supérieur et un nombre double de fibrilles constituent-ils des critères suffisants pour maintenir l'existence du genre *Borrelia* ? Il est évident que la complexité anatomique va croissant des leptospires aux cristispires en passant par les tréponèmes et les borrelia : le diamètre cellulaire augmente, le nombre des fibrilles de l'appareil locomoteur croît proportionnellement ; par contre, l'épaisseur de l'enveloppe et le diamètre de l'unité fibrillaire demeurent pratiquement du même ordre. Une hypothèse phylogénique vient à l'esprit : les différents genres ne représenteraient peut-être que des étapes successives d'une évolution qui conduit progressivement des plus petites aux plus volumineuses *Spirochaetales*. Au cours de cette évolution, des *Spirochaetales* de diamètre intermédiaire entre les tréponèmes et les cristispires, avec un nombre de fibrilles également intermédiaire, auraient peut-être leur place pour combler le hiatus qui sépare les premiers des dernières. Une telle *Spirochaetale* de 1 µ de diamètre, possédant 60 à 100 fibrilles, saprophyte de l'intestin postérieur de *Cryptocercus punctulatus*, a été décrite par Grimstone (1963). Cette *Spirochaetale*, nettement plus volumineuse que la souche de *B. hispanica* utilisée dans le

(*) Nous remercions M. Veron d'avoir bien voulu effectuer cette détermination.

présent travail, est peut-être un élément de transition entre le genre *Treponema* et le genre *Cristispira*. Dans cette perspective, le genre *Borrelia* semble devoir être conservé.

La différenciation classique des genres *Treponema* et *Borrelia* basée sur les procédés de coloration et d'examen en microscopie optique n'est peut-être pas à rejeter. Cette différenciation ne repose pas à proprement parler sur des différences d'affinité tinctoriale, mais reflète plutôt les dimensions de la cellule. En effet le diamètre des tréponèmes (à plus forte raison des leptospires) est constamment inférieur à la moitié de la longueur d'onde des rayons médians du spectre de la lumière ; ces cellules se situent donc en-deçà des limites du pouvoir de résolution du microscope optique et ne peuvent être perçues. On conçoit que les borrelia qui ont un diamètre supérieur à 0,30 μ soient plus aisément perceptibles. Pour fixer une limite entre les genres *Treponema* et *Borrelia*, et puisque cette limite dans nos connaissances actuelles, est obligatoirement fonction du diamètre cellulaire, les procédés de coloration peuvent aider à cette distinction des deux genres.

E. — La distinction des espèces dans le genre *Treponema* est classiquement fondée sur des données relatives à l'habitat chez l'homme et le lapin et sur les manifestations d'un pouvoir pathogène éventuel (Breed, Murray et Smith, 1957). Cette façon de procéder n'est pas satisfaisante. En effet les microorganismes répondant à la définition du genre *Treponema* sont très répandus dans la nature, en dehors de l'homme et du lapin ; on en trouve dans les boues, chez les mollusques, dans la panse des ruminants, etc...

L'étude anatomique de différentes souches appartenant à différentes espèces du genre *Treponema* ne révèle aucun élément caractéristique susceptible de permettre une distinction des espèces. L'étude antigénique, par contre, permet d'individualiser des espèces ; mais il faut mettre en jeu des immun-anticorps qui ne réagissent qu'avec les constituants de la surface cellulaire, c'est-à-dire qu'il faut n'utiliser que la réaction d'agglutination.

Une classification des tréponèmes reposant sur ces principes devrait à l'avenir éviter des confusions aussi regrettables que celle qui s'est produite pour la souche cultivable de Reiter (1960), désignée *T. pallidum* sous prétexte qu'elle provenait d'une lésion syphilitique. Au cours du présent travail, nous avons adopté pour cette souche la dénomination de *T. reiteri*, nous conformant ainsi aux règles de la nomenclature. Il serait d'ailleurs probablement plus logique de la dénommer *T. phagedenis*, car antigéniquement elle est très voisine, sinon identique, à la souche cataloguée *T. phagedenis* Noguchi, 1912, isolée par Vinzent en 1934 et figurant dans la collection de l'Institut Pasteur.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

1) Nous avons étudié l'anatomie et la constitution antigénique de six souches du genre *Treponema* appartenant chacune à une espèce distincte et d'une souche des genres *Borrelia, Leptospira* et *Cristispira.* Nous avons précisé la structure anatomique et antigénique des espèces du genre *Treponema* en étudiant des fractions de *T. reiteri.*

2) Les *Spirochaetales* sont entourées d'une enveloppe qui est souple, élastique et peu résistante.

L'étude anatomique, chimique et immunologique de l'enveloppe de *T. reiteri* révèle son analogie avec les trois feuillets qui représentent la partie de la paroi des eubactéries à Gram négatif, visible dans des conditions de la microscopie électronique classique. Comme cette paroi, l'enveloppe est composée de lipides, de polyosides et de protéines ; elle contient de nombreux antigènes dont la spécificité est portée par des polyosides liés à des lipides.

Le décollement de cette enveloppe survient dans des conditions défavorables de croissance ; il est à l'origine d'une série d'aspects morphologiques que l'on a considérés, à tort, comme les différentes phases d'un cycle évolutif. Les *Spirochaetales* se multiplient exclusivement par division transversale.

3) Le corps cellulaire qui représente pondéralement les trois-quarts environ du spirochète, est constitué par l'ensemble du cytoplasme et du noyau. Le corps cellulaire est limité par une membrane qui possède à la fois les caractères de la membrane cytoplasmique et certains caractères de la paroi des bactéries. Cette membrane limitant le cytoplasme contient le glycosaminopeptide et assure aux *Spirochaetales* leur forme hélicoïdale ; elle est moins rigide que la paroi des bactéries car les *Spirochaetales* sont des cellules flexibles. Par ailleurs elle présente une image microscopique analogue à celle de la membrane cytoplasmique des bactéries ; par ses replis intracytoplasmiques elle constitue les mésosomes. Parce que cette membrane limitant le cytoplasme possède le glycosaminopeptide caractéristique de la paroi bactérienne, nous la qualifions de « pariéto-cytoplasmique ».

4) Les *Spirochaetales* possèdent un appareil locomoteur interne, situé entre l'enveloppe et la membrane pariéto-cytoplasmique.

Dans le genre *Leptospira,* l'appareil locomoteur est constitué d'un unique élément, rectiligne ou curviligne : l'axostyle. Le corps cellulaire est enroulé en hélice autour de l'axostyle.

Dans les genres *Treponema* et *Borrelia,* l'organe locomoteur est constitué de 3 à 15 fibrilles, peut-être davantage, disposées parallèlement. Le faisceau de fibrilles est enroulé en hélice autour du corps cellulaire. Fibrilles et corps cellulaire tournent selon un même pas de vis mais en sens contraire : si l'enroulement du faisceau de fibrilles est dextre, celui du corps cellulaire est senestre.

Dans le genre *Cristispira,* le nombre de fibrilles atteint plusieurs centaines mais leur disposition est la même que dans les genres *Treponema* et *Borrelia.*

D'une façon générale, le nombre des éléments de l'appareil locomoteur croît proportionnellement au diamètre du corps cellulaire dont l'accroissement est régulier dans l'ordre suivant : leptospires (diamètre cellulaire le plus petit), tréponèmes, borrelia et cristispires (diamètre cellulaire le plus grand). Par contre, le diamètre de la fibrille demeure constant.

5) Les *Spirochaetales* sont des *procaryotes.*

Elles contiennent le glycosaminopeptide qui confère au revêtement cellulaire sa solidité. Elles possèdent des mésosomes et ne présentent pas de mitochondries intracytoplasmiques. Leur matériel nucléaire n'est pas inclus dans une membrane.

6) Les *Spirochaetales* sont des *Schizomycetes ;* elles constituent l'ordre des *Spirochaetales* Buchanan, 1918, définies comme des cellules « hélicoïdales, flexibles et mobiles » ; à cette définition nous devons désormais ajouter la précision suivante : « mobiles grâce à un appareil locomoteur interne situé entre une enveloppe externe souple et une membrane pariéto-cytoplasmique plus rigide ».

Les *Spirochaetales* sont classiquement divisées (Breed, Murray et Smith, 1957) d'après la morphologie observée au microscope optique, en deux familles : les *Spirochaetaceae* et les *Treponemataceae.*

a) Les *Spirochaetaceae* sont définies par leur longueur (30 à 500 μ) et la présence de structures visibles dans la cellule (filament axial, striation...). Cette famille comprend trois genres : *Spirochaeta, Saprospira* et *Cristispira.*

b) Les *Treponemataceae* sont définies par des dimensions plus réduites (4 à 16 μ de longueur) et l'absence de structure cellulaire visible. Cette famille comprend trois genres : *Treponema, Borrelia* et *Leptospira.*

D'après les données que nous apportons, cette classification des *Spirochaetales* en deux familles n'est pas justifiée. En effet on retrouve d'une part une structure anatomique analogue dans les espèces des genres *Treponema, Borrelia* et *Cristispira.* D'autre part, le degré de perception de détails anatomiques ne saurait être un critère de famille ; dans les espèces du genre *Cristispira,* les dimensions cellulaires sont telles que l'on perçoit directement certains détails au microscope optique ; dans les espèces des genres *Treponema* et *Borrelia,* ces mêmes détails ne sont retrouvés qu'au microscope électronique. Enfin, si l'on tient compte de la disposition de l'appareil locomoteur, il y a plus d'analogie entre les genres *Treponema, Borrelia* et *Cristispira* qu'entre l'un de ces genres et le genre *Leptospira.*

C'est pourquoi, dans l'état actuel de nos connaissances, nous proposons de grouper les *Spirochaetales* des genres *Treponema, Borrelia* et *Cristispira* dans une famille unique, la famille des *Treponemataceae* Robinson, 1948.

Le genre *Leptospira* est exclu de cette famille et nous proposons de créer pour lui une famille nouvelle : les *Leptospiraceae* nov. fam., avec pour genre type le genre *Leptospira*.

Quant au genre *Spirochaeta* avec pour espèce type, *Spirochaeta plicatilis* Ehrenberg, 1838, nous ne retrouvons plus actuellement d'espèces correspondant à cette définition. Enfin, le genre *Saprospira* Gross, 1911, dont les cellules n'ont pas d'appareil locomoteur interne, n'a pas sa place parmi les *Spirochaetales* mais doit être classé dans la famille des *Flexibacteriaceae* (Fox et Lewin, 1963), ordre des *Flexibacterales* Soriano, 1945, ou des *Myxobacterales* Jahn, 1915.

Dans ces conditions, la famille des *Spirochaetaceae* ne semble pas devoir être maintenue.

7) La distinction des genres telle qu'elle a été établie par l'anatomie peut être confirmée par l'étude de la constitution antigénique.

L'analyse antigénique des *Spirochaetales* a été effectuée par l'agglutination, la fixation du complément, l'immunoprécipitation en gel et l'immunofluorescence. Elle montre que l'immunofluorescence est la réaction la plus sensible pour révéler les communautés antigéniques chez les *Spirochaetales* ; elle est toujours positive là où d'autres techniques sont défaillantes.

On note l'existence de communautés antigéniques constantes entre les espèces des genres *Treponema* et *Borrelia* ; il n'y a, par contre, aucune communauté antigénique décelable entre les espèces des genres *Treponema, Cristispira* et *Leptospira*.

8) L'anatomie ne permet pas la distinction des différentes espèces dans le genre *Treponema* mais cette distinction est rendu possible par les données immunologiques.

Entre les différentes souches du genre *Treponema*, la spécificité antigénique des constituants cellulaires est d'autant plus marquée que ceux-ci sont situés plus superficiellement. La réaction d'agglutination qui seule révèle exclusivement les antigènes de la surface cellulaire est la réaction de choix pour la détermination des espèces du genre *Treponema*.

BIBLIOGRAPHIE.

Babudieri, R., 1958. — Die Feinstruktur der Leptospiren und anderer Spirochäten. *Zbl. Bakt., I, Abt. Orig.*, **173**, 386.

Bailey, A. D. and Worboys, B. D., 1960. — The lamellibranch cristalline style. *Biochem. J.*, **76**, 491.

Bangham, A. D. and Horne, R. W., 1964. — Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface active agents as observed in the electron microscope. *J. Mol. Biol.*, **8**, 660.

Barbu, E., Panigel, J. et Quash, G., 1961. — Caractérisation immunologique des ribosomes. *Ann. Inst. Pasteur*, **100**, 725.

Bentz, M., 1957. — Contribution à l'étude de *Treponema pallidum*, souche Reiter. Thèse Doct. Pharm., Bordeaux, Drouillard.

Berkeley, C., 1959. — Some observations on *Cristispira* in the cristalline style of *Saxidomus giganteus* Deshayes and in that of some other *Lamellibranchiata. Canad. J. Zool.*, **37**, 53.

Bladen, H. A. and Hampp, E. G., 1964. — Ultrastructure of *T. microdentium* and *B. vincentii. J. Bact.*, **87**, 1180.

Borrel, A. et Cerdoveanu, P., 1907. — Membrane ondulante du *Sp. balbianii. C. R. Soc. Biol.*, **62**, 1102.

Boyden, A. A., 1962. — Perspectives in molecular taxonomy, Taxonomic Biochemistry and Serology. New York, Ronald Press.

Boyden, A. A., 1963. — Precipitin testing and classification. *Syst. Zool.*, **12**, 1.

Bradfield, J. R. G. and Cater, D. B., 1952. — Electron-microscopic evidence on the structure of spirochetes. *Nature*, **169**, 944.

Breed, R. S., Murray, E. D. G. and Smith, N. R., 1957. — Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore, Williams and Williams.

Brenner, S. and Horne, R. W., 1959. — A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim. Biophys. Acta*, **34**, 103.

Certes, A., 1882. — Les parasites et les commensaux de l'huître. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, **7**, 374.

Chapmann, A., Murray, R. G. E. and Salton, M. R. J., 1963. — The surface anatomy of *Lampropedia hyalina*, **158**, 498.

Cohn, F., 1854. — Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der mikroskopischen Algen und Pilze. *Nov. Act. Leo. Carol*, **24**, 103.

Coutts, W. E. and Coutts, W. R., 1953. — Treponema pallidum buds, granules, and cysts as found in human syphilitic chancres and seen in fixed unstained smears observed under dark-ground illuminations. *Amer. J. Syph.*, **37**, 29.

Cummins, C. S., 1962. — Immunochemical specificity and the location of antigens in bacterial cell in microbial classification. XII^e Symp. Microb. Cambridge, University Press.

Czekalowski, J. W., 1963. — Electronmicroscopal studies on the structure of leptospirae. *Acta Leidensia*, **32**, 71.

Czekalowski, J. W. and Eaves, G., 1954. — Formation of granular structures by *Leptospirae* as revealed by the electron microscop. *J. Bact.*, **67**, 619.

D'Alessandro, G. and Dardanoni, L., 1953. — Isolation and purification of the protein antigen of the Reiter treponeme. *Amer. J. Syph.*, **37**, 137.

Delamater, E. D., Haanes, M. and Wiggal, R. H., 1951a. — Studies on the life cycle of spirochetes, I, The use of phase contrast microscopy. *Amer. J. Syph.*, **34**, 122.

Delamater, E. D., Haanes, M. and Wiggal, R. H., 1951b. — Studies on the life cycle of spirochetes VIII, Summary and comparison of observation on various organisms. *J. Invest. Derm.*, **16**, 231.

De Petris, S., 1965. — J. Ultrastr. Res., sous presse.

Dupouey, P., 1962. — Comparaison par des techniques immunologiques de six espèces de tréponèmes anaérobies d'origine génitale. Thèse Doct. Med., Paris.

Ehrenberg, Ch. G., 1833. — Die Infusions-tierchen als volkommene Organismen. Leipzig.

Ehrlich, P. et Hata, S., 1911. — La chimiothérapie expérimentale des Spirilloses. Paris, Maloine.

Fantham, H. B., 1907. — The movements of spirochaetes as seen in *Sp. balbianii* and *Sp. anodontae*. Brit. Assoc. Rep., 554.

Faure, M. et Pillot, J., 1960. — Composition antigénique des tréponèmes, III, L'antigène lipidique de Wassermann. *Ann. Inst. Pasteur*, **99**, 729.

Fourneau, E., Trefouel, J. et T. et De Lestrange, Y., 1923. — Les dérivés de l'acide phénylarsinique dans le traitement des trypanosomiases et des spirilloses expérimentales. *Ann. Inst. Pasteur*, **37**, 551.

Fox, D. L. and Lewin, R. A., 1963. — A preliminary study of the carotenoides of some flexibacteria. *Canad. J. Microb.*, **9**, 754.

Frank, V. H., Lefort, M. und Martin, H. H., 1962. — Elecktronenoptische und chemische Untersuchungen und Zellwänden der Belaualge *Phormidium uncinatum*. *Z. Naturforsch.*, 17b, 262.

Fulton, J. D. and Smith, P. J. C., 1960. — Carbohydrate metabolism in *Spirochaeta recurrentis*. *Biochem. J.*, **76**, 491.

Galton, M. M., Powers, M. S., Hall, A. D. and Cornell, R. G., 1958. — A rapid macroscopic-slide screening test for the serodiagnosis of leptospirosis. *Amer. J. vet. Res.*, **19**, 505.

Gangel, G. und Themann, H., 1956. — Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Entwicklungsstadien bei Leptospiren. *Arch. Hyg.*, **140**, 559.

Gelperin, A., 1949. — Morphology, cultural characteristics, and a method for mass cultivation by the Reiter spirochete. *Amer. J. Syph.*, **33**, 101.

Gel'tcer, R. R. et Krylova, O. P., 1957. — En russe. Données sur l'étude des granules des *Spirochaetales*. *Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. S.S.S.R.*, **28**, 65.

Ginger, C. D., 1963. — Isolation and characterization of muramic acid from two spirochaetes : *B. duttonii* and *L. biflexa*. *Nature*, **199**, 159.

Ginger, C. D., 1964. — Communication personnelle.

Glauert, A. M., Kerridge, D. and Horne, R. W., 1963. — The fine structure and mode of attachment of the sheathed flagellum of *Vibrio metchnikovii*. *J. Cell. Biol.*, **18**, 327.

Grimstone, A. V., 1963. — A note on the fine structure of a spirochaete. *Quart. J. microsc. Sci.*, **104**, 145.

Gross, J., 1912. — Ueber Systematik Struktur und Fortpflanzung der Spironemacea. *Cbl. Bakt. I. Orig.*, **65**, 83.

Gunsalus, I. C. and Stanier, R. Y., 1960. — The bacteria. New York, Academic Press.

Haberkorn, G. A., 1963. — Untersuchungen über das Verhalten von Rückfallfieberspirochaeten insbesondere der Borrelia - crocidurae - Gruppe in Kliederlaus. *Z. Tropenmed. Parasit.*, **14**, 209.

Hardy, P. H. and Nell, E. E., 1957. — Study of the antigenic structure of *T. pallidum* by specific agglutination. *Amer. J. Hyg.*, **66**, 160.

Heisch, R. B. and Harvey, A. E. C., 1962. — The development of *S. duttonii* and *S. recurrentii* in *Pediculus humans*. *Parasitology*, **52**, 77.

Hampp, E. G., 1951. — Further studies on the significance of spirochaetal granules. *J. Bact.*, **62**, 347.

Hampp, E. G., Scott, D. B. and Wyckoff, R. W. G., 1948. — Morphologic characteristics of certain cultured strains of oral spirochetes and *T. pallidum* as revealed by the electron microscope. *J. Bact.*, **56**, 755.

Kabat, E. A., 1958. — Immunological approaches to polysaccharide and mucopolysaccharide structure, Chemistry and biology of mucopolysaccharides. London, Churchill.

Kabat, E. A. and Mayer, M., 1961. — Experimental immunochemistry. Springfild, Thomas.

Kawata, T. and Inoue, T., 1964. — Fine structure of the Reiter treponeme as revealed by electron microscopy using thin sectioning and negative staining techniques. *Jap. J. microbiol.*, **8**, 49.

Kellenberger, E. and Ryter, A., 1964. — The modern development in electron microscopy. New York, Academic Press.
Landsteiner, K., 1936. — The specificity of serological reactions. Springfield, Thomas.
Laveran, A. et Mesnil, F., 1901. — Sur la nature bactérienne du prétendu trypanosome de l'huître. *C. R. Soc. Biol.*, **53**, 883.
Lewin, R. A., 1962. — *Saprospira grandis* Gross ; and suggestions for reclassifying helical, apochloratic, gliding organisms. *Canad. J. Microbiol.*, **8**, 555.
Listgarten, M. A., Loesche, W. J. and Socransky, S. S., 1963. — Morphology of *T. microdentium* as revealed by electron microscopy of ultrathin sections. *J. Bact.*, **85**, 932.
Listgarten, M. A. and Socransky, S. S., 1964. — Electron microscopy of axial fibrils, outer envelope and cell division of certain oral spirochetes. *J. Bact.*, **88**, 1087.
Loiseleur, J., 1963. — Techniques de laboratoire, Chimie Biologique. Paris, Masson.
Lwoff, A., 1958. — L'espèce bactérienne. *Ann. Inst. Pasteur*, **94**, 2.
Marchoux, E. et Salimbeni, A., 1903. — La spirillose des poules. *Ann. Inst. Pasteur*, **17**, 549.
Mollinedo, R., 1941. — Essai sur le cycle évolutif des spirochètes. Thèse Doc. Sc., Paris.
Murray, R. G. E., Steed, P. and Elson, H. E., 1965. — Communication personnelle.
Nelson, R. A. and Mayer, M. M., 1949. — Immobilization of *Treponema pallidum in vitro* by antibody produced in syphilitic infection. *J. Exp. Med.*, **89**, 369.
Nicolle, C. et Blanc, G., 1914. — Les spirilles de la fièvre récurente sont-ils virulents aux phases successives de leur évolution chez le pou ? Démonstration de leur virulence à un stade invisible. *C. R. Acad. Sci.*, **158**, 1815.
Olivier, H. R., 1963. — Traité de Biologie appliquée. Paris, Maloine.
Oudin, J., 1955. — L'analyse immunochimique par la méthode des gels, Moyens et techniques d'identification des antigènes. *Ann. Inst. Pasteur*, **89**, 531.
Ovchinnikov, N. M., 1955. — En russe. Sur l'existence des formes non spiralées du tréponème pâle. *Vest. Venerol. Dermatol. S.S.S.R.*, **3**, 32.
Ovchinnikov, N. M. et Vtyurin, B. V., 1961. — En russe. Etude de certaines particularités de la structure de *Treponema pallidum* au microscope électronique. *Vest. Venerol. Dermatol. S.S.S.R.*, **35**, 48.
Pease, P., 1956. — Some observations upon the development and mode of attachement of the flagella in *Vibrio* and *Spirillum* species. *Cell. Res.*, **10**, 234.
Pettit, A., 1928. — Contribution à l'étude des Spirochétidés. Paris.
Perkins, H. R. and Allison, A. C., 1963. — Cell wall constituents of Rickettsiae and Psittacosis-lymphogranuloma organisms. *J. Gen. Microbiol.*, **30**, 469.
Piechaud, M., 1959. — Coloration sans hydrolyse du noyau des bactéries. *Ann. Inst. Pasteur*, **86**, 787.
Pillot, J., 1962. — La culture des tréponèmes. I. Milieu de base et facteur sérum pour la culture du tréponème Reiter. *Ann. Inst. Pasteur*, **103**, 231. II. La culture du tréponème Reiter et des autres tréponèmes. Discussion. Ibid..., 373.
Pillot, J., Betz, A., Colombani, J. et Ripault, J., 1965. — The problem of positive complement fixation reactions with the Reiter treponema in the absence of syphilis. Role of a polysaccharide antigen. *Brit. J. Vener. Dis.*, sous presse.
Pillot, J. et Daguet, G., 1965. — Variations de la sensibilité et de la spécificité de la réaction d'immunofluorescence appliquée au diagnostic sérologique de la syphilis en fonction du conjugué et de l'antigène utilisés. *Bull. Soc. Fr. Dermatol.*, sous presse.
Pillot, J. et D'Azambuja, S., 1963. — L'immunoflorescence indirecte et la réaction de fixation du complément réalisées avec *Leptospira icterohaemorrhagiae*. *Ann. Inst. Pasteur*, **104**, 137.

Pillot, J. et Dupouey, P., 1964. — Composition antigénique des tréponèmes. IV. Solubilisation et purification des antigènes polyosidiques du tréponème Reiter. *Ann. Inst. Pasteur*, **106**, 456. V. Étude immunologique des antigènes polyosidiques du tréponème Reiter. Discussion. Ibid..., 617.

Pillot, J., Dupouey, P. et Faure, M., 1960. — Composition antigénique des tréponèmes. II. Etude de la réaction croisée tréponème pâle-tréponème Reiter à l'aide de la réaction de fixation du complément et de la précipitation en milieu gélifié. *Ann. Inst. Pasteur*, **98**, 734.

Pillot, J., Dupouey, P. et Ryter, A., 1964. — La signification des formes atypiques et la notion de cycle évolutif chez les spirochètes. *Ann. Inst. Pasteur*, **107**, I : 484, II : 663.

Pillot, J. et Faure, M., 1959. — Composition antigénique des tréponèmes, I. L'antigène protéique de groupe de la souche Reiter. *Ann. Inst. Pasteur*, **96**, 196.

Prevot, A. R., 1957. — Manuel de classification et de détermination des bactéries anaérobies. Paris, Masson.

Reiter, H., 1960. — Uber den sog. « Reiter-Stamm » der Spirochaeta pallida, seine Geschichte, Isolierung, Fortzüchtung, Spezifität und Verwendungsmöglichkeiten. *Med. Welt*, **14**, 712.

Romano, A. H. and Peloquin, J. P., 1963. — Composition of the sheath of *Sphaerotilus natans*. *J. Bact.*, **86**, 252.

Ryter, A. und Kellenberger, E., 1958. — Etude au microscope électronique de plasmas contenant de l'acide désoxyribonucléique. *Z. Naturforsch.*, 13b, 597.

Salton, M. R. J., 1964. — The Bacterial cell wall. Amsterdam, Londres et New York. Elsevier.

Salton, M. R. J. and Shafa, F., 1958. — Some changes in the surface structure of gram-negative bacteria induced by penicillin action. *Nature*, **181**, 1321.

Schaudinn, F., 1907. — Zur Kenntniss der Spirochaeta pallida und anderen Spirochaetenarten. *Arbeit a. d. Kaiserl. Gesundh.*, **26**, 11.

Sebald, M. et Veron, M., 1963. — Teneur en bases de l'A.D.N. et classification des vibrions. *Ann. Inst. Pasteur*, **105**, 897.

Sergent, E. et Foley, H., 1908. — Fièvre récurrente du Sud-Oranais et Pediculus vestimenti. *Bull. Soc. Path. Exot.*, **1**, 174.

Simpson, C. F. and White, F. H., 1964. — Ultrastructural variations between hooked and nonhooked leptospires. *J. Infect. Dis.*, **114**, 69.

Stalheim, O. H. V. and Wilson, J. B., 1964. — Cultivation of *Leptospirae*. I. Nutrition of *Leptospira canicola*. *J. Bact.*, **88**, 48. II. Growth and lysis in synthetic medium. Ibid..., 55.

Stanier, R. Y., Doudoroff, M. and Adelberg, E. A., 1958. — Nutritional classification of organisms, in general Microbiology, London, Mac. Millan.

Stanier, R. Y., Doudoroff, M. and Adelberg, E. A., 1963. — The Microbial World. Englewood Cliffs, N. J., Prentice Hall.

Steinman, H. G., Oyama and Schulze, H. O., 1954. — VI, The total vitamin requirements of the Reiter treponeme. *J. Bact.*, **67**, 597.

Strominger, J. L., 1962. — Biosynthesis of bacterial cell walls. *Fed. Proc.*, **21**, 134.

Stuart, R. D., 1946. — The preparation and use of a simple culture medium for *Leptospirae*. *J. Path. Bact.*, **58**, 343.

Swain, R. H. A., 1955. — Electron microscopic studies of the morphology of pathogenic spirochetes. *J. Path. Bact.*, **69**, 117.

Van Thiel, P. H., 1959. — Are Spirochaetes bacteria or protozoa ? *Antonie v. Leenwenhoeck*, **25**, 161.

Veldkamp, H., 1960. — Isolation and characteristics of *Treponema zuelzerae nov. spec.*, on anaerobic, free living spirochete. *Antonie v. Leeuwenhoeck*, **26**, 103.

Von Prowazek, S., 1907. — Vergleichende Spirochaeta-Untersuchungen. *Arbeit a. d. Kaiserl. Gesundh.*, **26**, 23.

Warburg, O. und Christian, W., 1942. — Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Biochem. Z.*, 310, 384.

Williams, M. A. and Chapman, G. B., 1961. — Electron microscopy of flagellation in species of *Spirillum*. *J. Bact.*, **81**, 195.

Woratz, H., 1954. — Ueber Ruheformen der Leptospiren. *Zbl. Bakt. I. Orig.*, **160**, 613.

TABLE DES MATIÈRES.

INTRODUCTION 9

CHAPITRE I. — Matériel et Méthodes 14

I. Souches et milieux de culture 14
A. Souches cataloguées 14
B. Souches non cataloguées 14

II. Les procédés d'observation 16
A. L'observation à l'état frais 16
B. Techniques de microscopie électronique 16
1. Contraste négatif 16
2. Coupes minces 16

III. Les techniques biochimiques 16

IV. Les techniques immunologiques 17
A. La préparation des immunsérums 17
B. Le problème de la réactivité *in vitro* des antigènes des *Spirochaetales*. Les modalités techniques 18
1. La réaction d'agglutination 18
2. La réaction de fixation du complément 18
3. La réaction d'immunofluorescence 19
4. L'immunoprécipitation en gel 20

CHAPITRE II. — Structure anatomique des *Spirochaetales* au microscope électronique 22

I. Etude en contraste négatif 22
a) Etude de cinq tréponèmes 22
b) Etude d'une borrelia 23
c) Etude d'une leptospire 24

II. Etude en coupes minces 24
a) Etude de quatre tréponèmes 25
b) Etude d'une borrelia 25
c) Etude d'une cristispire 26
d) Etude d'une leptospire 28

Conclusions 29

CHAPITRE III. — Constitution antigénique des *Spirochaetales* .. 31

I. Etude des communautés antigéniques entre les espèces des genres *Treponema, Borrelia* et *Leptospira* 31

II. Etude des communautés antigéniques entre une espèce du genre *Cristispira* et des espèces appartenant à d'autres genres de *Spirochaetales* 34

Conclusions 36

Chapitre IV. — La signification des formes atypiques et la notion de cycle évolutif chez les *Spirochaetales* 36

I. Les formes « rondes 38

A. Les conditions de leur apparition dans les cultures. Etude à l'état frais 38

B. La formation artificielle des sphéroïdes à partir des formes hélicoïdales 39

C. Etude en microscopie électronique 41

D. L'inhibition de la vésiculation 41

E. Etude chimique 42

F. Etude immunologique 43

1. L'état immunologique de la surface 43

2. Etude qualitative et quantitative des antigènes 43

G. Physiologie de la vésiculation naturelle 46

II. Les formes granuleuses 47

III. Les foyers de multiplication 48

Conclusions 49

Chapitre V. — La structure de *Treponema reiteri* 51

I. Caractéristiques physiques de l'enveloppe et de la membrane 51

1. L'enveloppe 51

2. La membrane 52

II. Caractéristiques chimiques de l'enveloppe et de la membrane 52

A. Sensibilité *in situ* aux enzymes et à certains agents chimiques 52

1. L'enveloppe 52

2. La membrane 52

B. Recherche et localisation du glycosaminopeptide 53

1. Identification chimique et dosage 53

2. Identification anatomique 55

III. Analyse immunochimique 57

A. Caractéristiques immunologiques de la cellule entière. 57

B. Contrôle immunologique de l'extraction de l'enveloppe. Composition chimique de l'enveloppe 58

C. Analyse immunologique de l'enveloppe et du corps cellulaire 63

1. Dénombrement des antigènes 64

2. Nature des antigènes de l'enveloppe et du corps cellulaire 65

Discussion 67
I La situation des *Spirochaetales* au sein des protistes. 67
II. Détermination des caractères propres aux *Spirochaetales*. 68
A. L'enveloppe 69
B. La membrane pariéto-cytoplasmique 72
C. L'appareil locomoteur 73
III. Le choix des caractères permettant la discrimination des genres 74
A. Distinction anatomique 74
B. Distinction antigénique 74
IV. Le choix des éléments permettant la discrimination des espèces 76
V. La classification actuellement admise des *Spirochaetales*. Modifications proposées 77
A. Classe 77
B. Ordre 77
C. Familles 78
D. Genres 80
E. Espèces 81
Résumé et conclusions 82
Bibliographie 85

DEUXIÈME THÈSE.

Propositions données par la Faculté :

Les acides teichoïques

Vu et approuvé :
Paris, le 9 Juin 1965.
Le Doyen de la Faculté des Sciences
Marc ZAMANSKY.

Vu
et Permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
Jean ROCHE.

Achevé d'imprimer le 10 Septembre 1965.

M. DECLUME, imprimeur Lons-le-Saunier, 519-65-250.
Septembre 1965 « Dépôt légal 3e trimestre 1965 — N° 5664 ».

Printed in France.